



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GLAUCIA WISOSKI DAL SANTO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO HEXÂNICO DAS
FOLHAS DE *Spondias mombin* L. (ANACARDIACEAE) EM MODELO
EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR ROTENONA EM
PEIXE-ZEBRA**

RECIFE

2020

GLAUCIA WISOSKI DAL SANTO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO HEXÂNICO DAS
FOLHAS DE *Spondias mombin* L. (ANACARDIACEAE) EM MODELO
EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR ROTENONA EM
PEIXE-ZEBRA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos.

Orientador Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

RECIFE

2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

S237a Santo, Glaucia Wisoski Dal.
Avaliação do efeito neuroprotetor do extrato hexânico das folhas de *spondias mombin* L. (Anacardiaceae) em modelo experimental da doença de Parkinson induzida por rotenona em peixe-zebra / Glaucia Wisoski Dal Santo.– 2020.
66 f: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Rotenona. 2. Doença de Parkinson. 3. Atividade antioxidante. 4. Peixe-Zebra. 5. *Spondias mombin*. I. Wanderley, Almir Gonçalves (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2021-101)

GLAUCIA WISOSKI DAL SANTO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO HEXÂNICO DAS
FOLHAS DE *Spondias mombin* L. (ANACARDIACEAE) EM MODELO
EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR ROTENONA EM
PEIXE-ZEBRA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

APROVADA EM 21/12/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley
(Presidente da Banca)

Profa. Dra. Leila Zanatta
(Avaliadora Externo)

Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico
(Avaliador Externo)

Prof. Dr. Edilson Dantas da Silva Junior
(Avaliador Externo)

Prof. Dr. Lêucio Duarte Vieira Filho
(Avaliador Externo)

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite
(Suplente Interno)

Prof. Dr. Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho
(Suplente Externo)

RESUMO

As bases moleculares que desencadeiam doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson (DP), ainda não estão totalmente compreendidas, mas, evidências indicam um envolvimento do estresse oxidativo, alterações mitocondriais e apoptose. *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae), conhecida popularmente como cajazeira é uma espécie frutífera, encontrada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Possui elevado teor de compostos fenólicos com conhecida atividade antioxidante e anti-inflamatória e é utilizada na medicina popular para tratar doenças gastrintestinais e processos inflamatórios. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a capacidade de atenuação dos efeitos deletérios induzidos pela neurotoxina rotenona (ROT) por meio do tratamento com o extrato hexânico das folhas de *Spondias mombin* (EHSm) sobre parâmetros de estresse oxidativo, captação de dopamina e comportamento em um modelo experimental da DP induzida por ROT em peixe-zebra (*Danio rerio*). A identificação fitoquímica do EHSm foi realizada por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (CG-EM) e cromatografia líquida de alto desempenho com detecção de matriz de diodo (CLAE-DAD). Além disso, análises antioxidante de DPPH, ABTS, CAT e poder redutor foram determinadas *in vitro*. Para estabelecer a concentração letal mediana (CL₅₀) de 96h, os peixes-zebra foram expostos a seis diferentes concentrações do EHSm (10 a 100 mg/L). Para avaliação das atividades comportamentais (novel tank e claro/escuro), estresse oxidativo (TBARS, grupamento SH, GSH, SOD, CAT, GST, O₂⁻ e NADPH) e captação de dopamina no cérebro, peixes zebra adultos de ambos os sexos foram divididos em seis grupos (n= 20-24/grupo) e tratados por 4 semanas, respectivamente. com DMSO 0,1% (veículo - controle), ROT (3 µg/L) e EHSm (5, 15 e 25 mg/L). Os resultados mostraram que a CG-EM identificou principalmente os compostos ciclogalifaraol (13,88%) e dl-α-tocoferol (8,08%), enquanto os resultados da CLAE-DAD indicaram a presença majoritária de quercetrina (6,54 mg/g) e rutina (8,83 mg/g). Nos testes *in vitro*, a concentração inibitória (CI₅₀) do EHSm foram DPPH (521,38±7,45 µg/mL, ABTS (1021,38±70,02 µg/mL), Capacidade Antioxidante Total (1291,12±16,10 µg/mL) e poder redutor 1568,65±16,15 µg/mL. A CL₅₀ estimada em 96h para o EHSm foi 58,42 mg/L. A rotenona induziu alterações nos parâmetros comportamentais (redução na entrada e no tempo gasto na área superior do tanque), a qual foi revertida totalmente pelo EHSm (25 mg/L). Nos parâmetros bioquímicos, o EHSm reverteu o aumento induzido pela exposição à rotenona nos valores de TBARS, tióis totais, produção de O₂⁻ e NADPH oxidase. Verificou-se também que os valores CAT, SOD e GSH aumentaram estatisticamente e o EHSm (25 mg/L) foi capaz de restaurar a atividade de captação de dopamina desencadeada

pela ROT. Em conclusão, o EHSm mitiga as respostas comportamentais e oxidativas da DP no peixe-zebra. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo preciso subjacente aos efeitos do EHSm na DP induzida pela rotenona em peixes-zebra.

Palavras-chave: Rotenona. Doença de Parkinson. Atividade Antioxidante. Peixe-Zebra. *Spondias mombin*.

ABSTRACT

The molecular bases that trigger neurodegenerative diseases such as Parkinson's Disease (PD) are not fully understood yet, however evidences indicate an involvement of oxidative stress, mitochondrial changes and apoptosis. *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae), popularly known as “*cajazeira*”, is a fruit species found in the North and Northeast regions of Brazil. It has a high content of phenolic compounds with known antioxidant and anti-inflammatory activity and is used in folk medicine to treat gastrointestinal diseases and inflammatory processes. In this context, the objective of the study was to evaluate the potential neuroprotective activity of the hexane extract of the leaves of *Spondias mombin* (EHSm) on parameters of oxidative stress, dopamine uptake and behavior in an experimental model of PD induced by rotenone (ROT) in zebrafish. The phytochemical identification of the EHSm was performed through by gas chromatography coupled with mass spectroscopy (GC-EM) and high performance liquid chromatography with diode matrix detection (HPLC-DAD), in addition antioxidant analyzes as DPPH, ABTS, CAT and reducing power were performed *in vitro*. In order to determine the median lethal concentration (LC₅₀) of 96h, zebrafish were exposed to six different concentrations of EHSm (10 to 100 mg/L). For assessment of behavioral activities (novel tank and light / dark), oxidative stress (TBARS, SH group, GSH, SOD, CAT, GST, O₂⁻ and NADPH) and dopamine uptake in the brain, adult zebra fish of both sexes were divided into six groups (n =20-24/group) and treated for 4 weeks with DMSO 0.1% (vehicle - control), ROT (3 µg/L) and EHSm (5, 15 and 25 mg/L) respectively. The results showed that CG-EM mainly identified the compounds cyclogalifaraol (13.88%) and dl- α -tocopherol (8.08%), while the results of HPLC-DAD indicated the majority presence of quercetrin (6.54 mg/g) and rutin (8.83 mg/g). In the *in vitro* tests, the inhibitory concentration (IC₅₀) of EHSm was DPPH (521.38±7.45 µg/mL), ABTS (1021.38±70.02 µg/mL), Total Antioxidant Capacity (1291.12±16.10 µg/mL) and reducing power 1568.65 ± 16.15 µg/mL. The estimated LC₅₀ in 96h for EHSm was 58.42 mg/L. Rotenone induced alteration (reduction in intake and time spent in the upper area of the tank), which was completely reversed by EHSm (25 mg/L). In biochemical parameters, EHSm reversed the increase induced by exposure to rotenone in TBARS, total thiols, O₂⁻ and NADPH oxidase production. Also, it was found that CAT, SOD and GSH values increased statistically, and EHSm (25 mg/L) was able to restore the dopamine uptake activity triggered by ROT. In conclusion, that EHSm mitigates the behavioral and oxidative responses of PD in zebrafish, however, further studies are needed to elucidate the precise mechanism underlying the effects of EHSm on PD induced by rotenone in zebrafish.

Keywords: Rotenone. Parkinson's Disease. Antioxidant Activity. Zebrafish. *Spondias mombin*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais mecanismos patológicos na DP: (A) estrutura normal; (B) neurodegeneração da via nigroestriatal e (C) presença de corpúsculos de Lewy intracitoplasmáticos. Adaptado de Dauer e Przedborski, 2003.	19
Figura 2 - Mecanismos de toxicidade induzidos pela rotenona em neurônios dopaminérgicos	22
Figura 3 - Peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>).....	23
Figura 4 - Número de genes ortólogos compartilhados entre diferentes espécies. Fonte Howe et al. (2013).....	24
Figura 5 - Esquema mostrando o desenho experimental.....	33
Figura 6 - Identificação por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa dos compostos químicos do EHSm.....	39
Figura 7 - Efeitos do extrato hexânico de <i>S. mombin</i> (EHSm) nos níveis espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, A) e níveis de glutathione (GSH, B) no cérebro do peixe-zebra. Os dados são apresentados como média ± E.P.M. n=6. Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001 comparado ao grupo controle	41
Figura 8 - Avaliação do efeito da rotenona (ROT) nos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, A) e avaliação do conteúdo de grupamentos sulfidríla (SH, B). DMSO: dimetilsulfóxido. Os dados são apresentados como média ± E.P.M. n=6. Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. ***p<0,0001 comparado ao grupo controle	42
Figura 9 - Avaliação do efeito da rotenona (ROT) e extrato hexânico de <i>S. mombin</i> (EHSm) sobre a distância total percorrida (A), número de cruzamentos (B), número de entradas (C) e tempo gasto na área superior do aparato (D) no novel tank. Os dados são apresentados como média ± E.P.M. n=20-24. Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005 comparado ao grupo controle, #p<0,05 comparado ao grupo rotenona.....	43
Figura 10 - Avaliação dos efeitos da rotenona (ROT) e do extrato hexânico de <i>S. mombin</i> (EHSm) no tempo de permanência na parte clara (A) e número de travessias (B) no teste claro/escuro. Os dados são apresentados como média ± E.P.M. n=12. Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.....	44

Figura 11 - Efeitos de rotenona (ROT) e do extrato hexânico de <i>S. mombin</i> (EHSm) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, A) e grupamentos sulfidríla (SH, B) no cérebro do peixe-zebra. Os dados são apresentados como média ± E.P.M. n=6. Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. *p<0,05, ****p<0,0001 comparado ao grupo de controle, ##p<0,01, ####p<0,0001 comparado ao grupo ROT	45
Figura 12 - Efeitos da rotenona (ROT) e do extrato hexânico de <i>S. mombin</i> (EHSm) sobre a atividade das enzimas catalase (A) e superóxido dismutase (B), níveis de glutathiona (C) e atividade de glutathiona transferase (D) avaliados em cérebro de peixe-zebra. Os dados são apresentados como média ± E.P.M. n=6. Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. **p<0,01, ***p<0,005, ****p<0,0001 comparado ao grupo controle, ####p<0,0001, comparado ao grupo ROT	47
Figura 13 - Efeitos da rotenona (ROT) e do extrato hexânico de <i>S. mombin</i> (EHSm) na produção de superóxido basal (A) e atividade de NADPH oxidase (B) avaliada em cérebro de peixe-zebra. Os dados são apresentados como média ± E.P.M. n=6. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. *p<0,05, ***p<0,005 comparado ao grupo controle, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,005 comparado ao grupo ROT	48
Figura 14 - Efeitos de ROT e EHSm na captação de L-[3H] dopamina no cérebro de peixe-zebra. Os dados são apresentados como média ± E.P.M. n=6. Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. *p<0,05 comparado ao grupo controle.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação das principais características de diferentes modelos animais (SIEBEL et al., 2015).....	24
Tabela 2 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do EHSm.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
ANOVA	Análise de variância
BSA	albumina sérica bovina
CL ₅₀	concentração letal 50%
CI ₅₀	concentração inibitória 50%
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CAT	catalase
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CDNB	1 cloro 2,4 dinitrobenzeno
DAT	transportador de dopamina
DP	Doença de Parkinson
DNP-SG	dinitrofenil S- glutationa
DMSO	dimetilsulfóxido
DTNB	ácido ditionitrobenzóico/reagente de Ellman
DOPAC	ácido 3, 4 – dihidroxifenilacético
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EHSm	extrato hexânico de <i>S. mombin</i>
ERs	espécies reativas
EROs	espécies reativas de oxigênio
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
GPx	glutaciona peroxidase
GST	glutaciona-S-transferase
GSSG	glutaciona oxidada
GSH	glutaciona reduzida
HVA	ácido homovanílico
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
KOH	hidróxido de potássio
LB	Liebermann Burchard
L-dopa	l- dihidroxifenilalanina

LPO	peroxidação lipídica
MAO	monoamina oxidase
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MDA	malondialdeído
NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
EtOAc	acetato de etila
nm	nanômetros
O ₂	oxigênio
O ₂ •-	ânion radical superóxido
OH•	radical hidroxila
RLs	radicais livres
ROT	rotenona
SH	grupamentos sulfidríla
SNpc	substância negra parte compacta
SOD	superóxido dismutase
SN	sistema nervoso
SNC	sistema nervoso central
TBARS	ácido tiobarbitúrico
TNB	ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
TCA	ácido tricloro acético
US EPA	United States Environmental Protection Agency

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	DOENÇA DE PARKINSON: ASPECTOS GERAIS	18
2.2	MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR ROTENONA.....	21
2.3	PEIXE-ZEBRA (<i>DANIO RERIO</i>).....	23
2.4	<i>SPONDIAS MOMBIN</i> L (ANACARDIACEAE).....	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	METODOLOGIA	28
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	28
4.2	PREPARAÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DE <i>S. MOMBIN</i> (EHSM)	28
4.3	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DO EHSM	28
4.3.1	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa (CG-EM) do EHSm	28
4.3.2	Cromatografia Líquida com detecção de matriz de diodo (CLAE-DAD)	29
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DO EHSM	29
4.4.1	Avaliação da atividade do DPPH+ (2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato) e ABTS + (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) no EHSm	29
4.4.2	Avaliação da capacidade antioxidante total (CAT) do EHSm	30
4.4.3	Avaliação do poder de redutor do EHSm	30
4.5	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	30
4.6	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	31
4.6.1	Protocolo para avaliação da toxicidade aguda (CL₅₀)	31
4.6.2	Protocolo de exposição do EHSm per se e ROT	31
4.6.3	Protocolo exposição a ROT e EHSm	32
4.7	AVALIAÇÕES DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	33
4.7.1	Avaliação da atividade locomotora com novel tank	33
4.7.2	Avaliação da atividade tipo ansiolítica com claro/escuro	33
4.8	ANÁLISE DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	34

4.8.1	Preparo e homogeneização do tecido.....	34
4.8.2	Peroxidação lípídica (TBARS)	34
4.8.3	Avaliação de conteúdo de grupamento sulfidrila-SH (tiol)	35
4.8.4	Determinação dos níveis da glutathiona (GSH).....	35
4.8.5	Avaliação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD).....	35
4.8.6	Avaliação da atividade enzimática da catalase (CAT).....	36
4.8.7	Avaliação da atividade enzimática da Glutathiona-S-Transferase (GST)	36
4.8.8	Produção de ânion superóxido (O ₂ -) e atividade da oxidase de di- hidronicotinamida-adenina fosfato de dinucleotídeo (NADPH)	37
4.9	ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE DOPAMINA	37
4.10	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	38
4.11	ESTATÍSTICA	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EHSM	39
5.1.1	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa (CG-EM) do EHSm	39
5.1.2	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do EHSm	40
5.2	AVALIAÇÃO ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO (DPPH, ABTS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL E PODER REDUTOR) DO EHSM.....	40
5.3	TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO DE EHSM EM PEIXE-ZEBRA	40
5.4	AVALIAÇÃO PARÂMETROS OXIDATIVOS EHSM PER SE E ROT ..	41
5.4.1	Avaliação do efeito de parâmetros oxidativos do extrato hexânico de Spondias mombin L. (EHSm) em peixe-zebra (per se).....	41
5.4.2	Avaliação do efeito da rotenona sobre a peroxidação lipídica (TBARS) e grupamentos sulfidrila (SH).....	42
5.4.3	Avaliação dos efeitos da rotenona na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), níveis de glutathiona (GSH) e atividade glutathiona transferase (GST).....	43
5.5	AVALIAÇÃO DO EHSM SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM PEIXE-ZEBRA EXPOSTOS A ROT	43
5.5.1	Teste de novel tank (NTT)	43
5.5.2	Teste de Claro/escuro (LDT)	44
5.6	AVALIAÇÃO DO EHSM SOBRE PARÂMETROS OXIDATIVOS EM ENCÉFALO DE PEIXE-ZEBRA TRATADOS COM ROTENONA	45
5.6.1	Peroxidação lipídica (TBARS) e grupamentos sulfidrila (SH)	45

5.6.2	Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), níveis de glutathiona (GSH) e atividade da glutathiona transferase (GST).....	46
5.6.3	Produção de ânion superóxido (O₂⁻) e atividade da oxidase de dihidronicotinamida-adenina fosfato de dinucleotídeo (NADPH)	47
5.7	AVALIAÇÃO DO EHSM SOBRE RECAPTAÇÃO DE DOPAMINA EM PEIXE-ZEBRA EXPOSTO A ROTENONA	48
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO	54
	REFERENCIAS	55
	APÊNDICE A - ARTIGO ACEITO NA REVISTA COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY, PART C	65
	ANEXO A – CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA	66

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma degeneração do sistema nervoso central de forma progressiva e crônica, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum, seguida por Alzheimer (NAGATSU et al., 2018). A fisiopatologia desta doença é caracterizada pela perda irreversível dos neurônios dopaminérgicos na substância negra, parte compacta (SNpc), e por acúmulo de agregados proteicos citoplasmáticos, conhecidos por corpos de Lewy, nos neurônios remanescentes (CALNE, 2005). Clinicamente a DP é diagnosticada pela presença de sintomas motores como bradicinesia, ou seja, lentidão dos movimentos voluntários e dificuldade em iniciar os movimentos, redução da quantidade de movimentos, também chamada de acinesia, tremores de repouso, rigidez muscular, alterações de marcha e instabilidade postural (WANG et al., 2015). Além disso, os sintomas motores são acompanhados por sintomas autonômicos, cognitivos e psiquiátricos (SANTANGELO et al., 2017). Dados epidemiológicos demonstram que a incidência e a prevalência da DP aumentam com o avanço da idade, ocorrendo em aproximadamente 1,5 a 2% das pessoas com mais de 65 anos (WANG et al., 2015).

A etiologia da DP ainda permanece elusiva, mas evidências crescentes indicam que a causa é multifatorial, envolvendo predisposição genética, características inatas do sistema dopaminérgico nigrostriatal no cérebro, exposição a toxinas ambientais, fatores imunológicos/inflamatórios, estresse oxidativo e envelhecimento (MOSLEY et al., 2012).

Atualmente, toxinas como a rotenona são utilizadas como modelo experimental da DP, no intuito de mimetizar uma ou mais características da doença e dessa forma contribuir para elucidação das suas causas, e desenvolvimento de novas terapias. Nesse sentido, torna-se importante a triagem de novas drogas em modelos experimentais *in vivo*, capazes de reverter ou atenuar as manifestações dessa doença.

O peixe-zebra (*Danio rerio*) tem sido amplamente utilizado como modelo animal para estudos de distúrbios neurológicos (KALUEFF et al., 2014). A atual popularidade do peixe-zebra como um modelo de pesquisa complementar as abordagens existentes em roedores podem ser explicadas devido ao baixo custo, curto período de reprodução e semelhança fisiológica com os seres humanos (NUNES et al., 2017). Fenótipos parkinsonianos têm sido induzidos em peixes-zebra por meio de manipulação genética ou toxinas dopaminérgica (FLINN et al., 2008; CUI et al., 2013).

Num aspecto geral, o manejo dos sintomas da DP, são caracterizados por uma combinação de medicamentos, terapias e ocasionalmente cirurgia. Os fármacos comumente

empregados no tratamento da DP (precursores de dopamina – levodopa, anticolinérgicos – biperideno, inibidores da monoamina oxidase tipo B – selegilina) agem atenuando os sintomas, no entanto, ainda não há tratamento que impeça a neurodegeneração.

O conhecimento da relação entre o estresse oxidativo e o desenvolvimento da DP, tem despertado o interesse na utilização de substâncias antioxidantes como novas abordagens terapêuticas, complementares ou não. Nos últimos anos, a busca por terapias derivadas de produtos naturais tem crescido consideravelmente, devido ao baixo custo, fácil obtenção e grande diversidade de metabólitos secundários encontrados em plantas. Assim, constituintes naturais derivados de plantas medicinais possuem grande importância, uma vez que esses compostos geralmente possuem amplo espectro de atividades biológicas, como antioxidantes.

Spondias mombin L. família Anacardiaceae, é uma espécie frutífera, nativa do Brasil, encontrada principalmente nas regiões norte e nordeste (TIBURSKI et al., 2011; CABRAL et al., 2016). É uma planta conhecida popularmente como cajazeira, que produz frutos nutritivos e de grande aceitação no mercado, sendo consumida *in natura* ou por meio de sucos, polpa, sorvetes. Alguns estudos têm relatado diferentes compostos químicos (ácido fenólico, carotenoides, ácido anacárdico e derivados fenólicos) de cajá, que exibem diferentes propriedades biológicas incluindo antibacteriana, antiviral, antioxidantes e gastroprotetora (NWORU et al., 2011; CABRAL et al., 2016; BRITO et al., 2018; SCHIASSI et al., 2018).

Considerando o uso desta espécie na etnomedicina, como anti-inflamatório e antioxidante e dados do nosso laboratório, que mostraram importante atividade antiulcerogênica em ratos obtidas com o extrato hexânico de *S. mombin* (EHS_m, 5, 10 e 20 mg/kg). Esse trabalho investigou se o EHS_m poderia reverter ou atenuar as manifestações comportamentais e bioquímicas no modelo experimental da doença de Parkinson induzida pela neurotoxina rotenona (ROT) em peixe-zebra na perspectiva de encontrar um agente promissor, que possa contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas contra doenças neurodegenerativas, como o Parkinson, ou incrementar as terapias já existentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

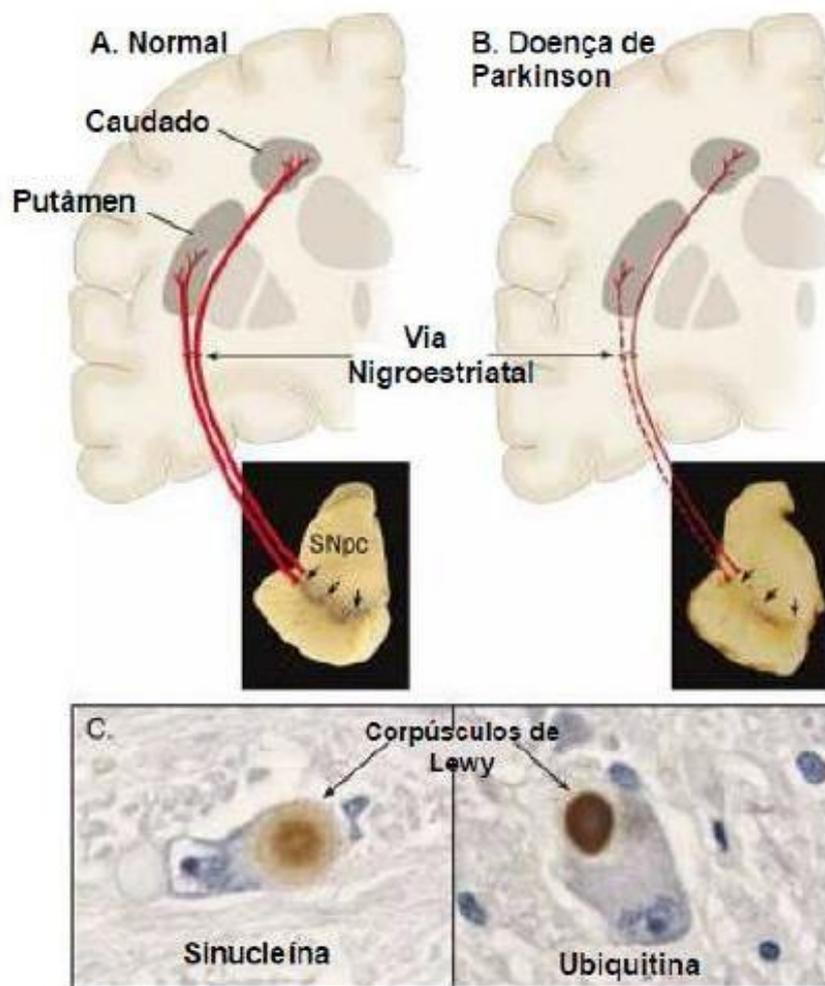
2.1 DOENÇA DE PARKINSON: ASPECTOS GERAIS

A doença de Parkinson (DP), descrita inicialmente por James Parkinson em 1817, e por ele denominada como “paralisia agitante”, é um distúrbio neurodegenerativo, de causa ainda desconhecida, mas que afeta aproximadamente 0,3% da população mundial, e aumenta para 1,5 – 2,0% em pessoas com mais de 60 anos de idade (WANG et al., 2015). No Brasil, segundo o instituto brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2000), existem aproximadamente 222 mil parkinsonianos, configurando uma média de 2% dos brasileiros, acima dos 60 anos, acometidos por essa patologia. Em geral, a doença atinge idosos acima dos 50 anos de idade, embora já tenha sido diagnosticada em adultos jovens, abaixo dos 40 anos e adolescentes (DIAS et al., 2016).

Patologicamente, a DP é classicamente descrita como uma neurodegeneração progressiva, caracterizada por tremor de repouso, rigidez muscular, redução dos movimentos e instabilidade postural. Esses sintomas são ocasionados, principalmente, pela perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc e, suas progressões para o núcleo caudado, levam a uma diminuição substancial dos níveis de dopamina e seus metabólitos, o ácido homovanílico (HVA) e o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) na via nigroestriatal (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; MOSLEY et al., 2012). Esses neurônios projetam-se para o estriado e sua perda leva a alterações na atividade dos circuitos neurais dentro dos gânglios da base que regulam o movimento, em síntese uma inibição da via direta e excitação da via indireta. A via direta inicia o movimento e age na manutenção do mesmo e, a via indireta inibe o movimento, assim, a perda dessas células leva a um distúrbio motor, pois a comunicação entre o tálamo e o córtex cerebral fica prejudicada (BEJJANI et al., 1999). A neurodegeneração observada na DP é associada, principalmente, aos neurônios dopaminérgicos, mas não restrita a eles, uma vez que os neurônios colinérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos também podem ser afetados. O sistema adenosinérgico também foi associado a DP, devido à sua interação com o sistema dopaminérgico e seus efeitos sobre a função motora (BRICHTA et al., 2013). Além da perda neuronal, são encontrados precipitados proteicos citoplasmáticos, também chamados de corpos de Lewy, constituídos principalmente pelas proteínas α -sinucleína, parkina e ubiquitina, (Figura 1) predominantes no sistema nervoso (SN) *locus coeruleus* e em menor quantidade nos neurônios corticais (LAMOTTE et al., 2016). A formação de agregados proteicos de α -sinucleína, resultam em disfunção neuronal, e, eventualmente morte celular. Além disso, o

acúmulo de α -sinucleína nos terminais sinápticos causa prejuízo na liberação de neurotransmissores em neurônios dopaminérgicos, devido as alterações causadas na vesícula sináptica que impedem o reagrupamento das vesículas de endocitose (NEMANI et al, 2010).

Figura 1 - Principais mecanismos patológicos na DP: (A) estrutura normal; (B) neurodegeneração da via nigroestriatal e (C) presença de corpúsculos de Lewy intracitoplasmáticos. Adaptado de Dauer e Przedborski, 2003.



A etiologia da DP ainda permanece elusiva, entretanto, fortes evidências indicam o envolvimento de disfunção mitocondrial, excitotoxicidade, estresse oxidativo, toxinas ambientais e fatores genéticos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; HIRSCH et al., 2013). Inicialmente postulava-se que a DP era um distúrbio não genético e prototípico, entretanto, nos últimos vinte anos, diversos genes têm sido associados à DP. Mutações, duplicações e triplicações do gene α -sinucleína, proteína com papel central nas inclusões eosinófilas, genes relacionados ao metabolismo mitocondrial como a *PINK1* e *PARK2*, genes com sensor redox

para estresse oxidativo como *DJ-1* e genes associados à autofagia como *ATP13A2*, *GBA* e *LRRK2*, genes associados a neuroinflamação (*HLA-DR*) também foram associados à DP (SIDRANSKY et al., 2009; EDVARDSON et al., 2012; BONIFATI et al., 2013; PICKRELL et al., 2015; GEGG; SCHAPIRA, 2016; SCHNEIDER; ALCALAY, 2017).

Em decorrência da perda neuronal, um número expressivo de pacientes parkinsonianos são acometidos também por sintomas não-motores, dentre eles, distúrbios neuropsiquiátricos, como depressão, ansiedade, apatia e psicose, distúrbios do sono, déficit cognitivo e do sistema nervoso autônomo, além de prejuízos ao olfato e disfunções gastrointestinais (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009; BONITO-OLIVA et al., 2014; MACK et al., 2016).

Apesar da neurodegeneração na DP ser considerada multifatorial, o papel da neuroinflamação e do estresse oxidativo têm sido uma das hipóteses mais estudadas nos últimos anos, com o intuito de melhor entender os mecanismos de morte neuronal presentes na etiologia dessa doença (MOSLEY et al., 2012).

Vários estudos sugerem que, devido o cérebro apresentar elevada taxa metabólica e conter níveis elevados de metais de transição como ferro e cobre, torna-se altamente susceptível a alterações no estado redox, como a redução da fosforilação oxidativa mitocondrial (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Sabe-se que as mitocôndrias são a principal fonte celular de espécies reativas (ERs) e estão envolvidas na homeostase do cálcio e regulação de vias destrutivas, subjacente à neurodegeneração seletiva na DP (BANERJEE et al., 2009). O complexo I é um importante ponto de entrada da cadeia respiratória e suas deficiências podem ser traduzidas em uma perda drástica de funções bioenergéticas que levam à instabilidade mitocondrial. O complexo I também produz a maioria das ERs geradas em mitocôndrias intactas (AMMAL KAIDERY; THOMAS, 2018). Uma ligação entre a disfunção do complexo I e a DP, foi estabelecida quando vários grupos relataram redução da atividade do complexo I no SN do cérebro humano, o principal local de perda neuronal na DP (SCHAPIRA; COOPER; et al., 1990; SCHAPIRA; MANN; et al., 1990; JANETZKY et al., 1994). Além disso, o cérebro é um tecido altamente rico em ácidos graxos poliinsaturados e pobre em defesas antioxidantes, o que o torna vulnerável aos danos mediados por espécies reativas, tanto de oxigênio (EROs) quanto espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (SANDERS; GREENAMYRE, 2014). Apesar da maior parte do dano oxidativo na DP ser encontrado no SN, a disfunção mitocondrial e a inibição do complexo I não estão limitadas ao cérebro, e o dano oxidativo tem sido relatado em tecidos periféricos de pacientes portadores da doença (SANDERS; GREENAMYRE, 2014). Os principais marcadores de estresse oxidativo que se encontram alterados na DP são peroxidação lipídica, dano à proteínas e principalmente a depleção dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

na SNpc, relacionada principalmente aos decréscimo da atividade do complexo mitocondrial I e da função mitocondrial (DEXTERA; JENNER, 2013; SANDERS; GREENAMYRE, 2014).

O diagnóstico clínico da DP é baseado pela presença de dois ou mais sinais motores, entretanto quando o quadro de DP é estabelecido a perda neuronal já se encontra acentuada, devido à grande reserva funcional do sistema dopaminérgico. Os sintomas se tornam evidentes e expressivos quando aproximadamente 70-80% dos neurônios dopaminérgicos na SNpc já estão irreversivelmente degenerados (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; HIRSCH et al., 2013). O fato de o processo neurodegenerativo estar num estágio avançado quando o diagnóstico é estabelecido, pode influenciar na efetividade clínica de diversos fármacos e agentes neuroprotetores testados, até então, no tratamento da DP.

As terapias atuais para o tratamento da DP, têm como o objetivo a redução da severidade dos sintomas, restabelecendo os níveis de dopamina, mas não fazem desaparecer a degeneração neuronal. Os protocolos atuais incluem anticolinérgicos, agonistas de receptores dopaminérgicos, inibidores da monoamina oxidase (MAO), L- dihidroxifenilalanina (L-DOPA), terapias e até mesmo cirurgias. No entanto esses tratamentos não impedem a progressão da doença, tratam apenas os sintomas motores por um período de tempo (STAYTE; VISSEL, 2014). Dessa forma, pesquisa relacionadas ao desenvolvimento de novos modelos animais de pesquisa, bem como a busca por novos compostos, capazes de promover neuroproteção na DP, são de extrema importância.

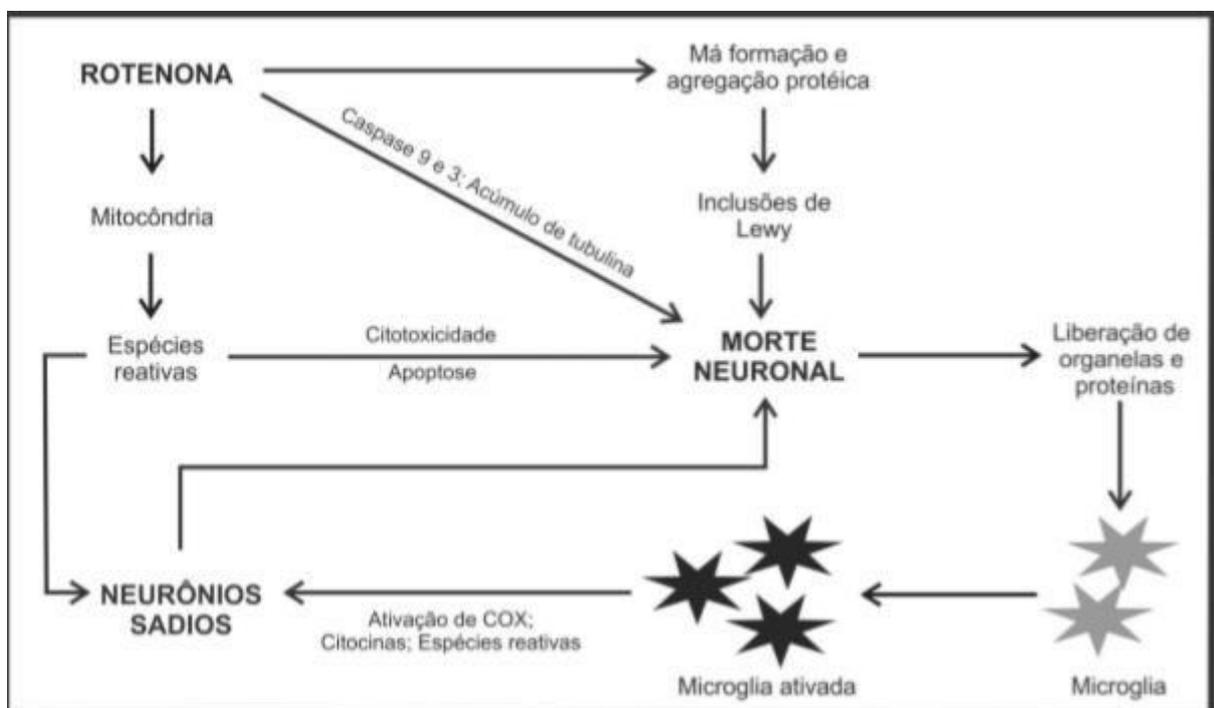
2.2 MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR ROTENONA

A fim de demonstrar relevância direta com DP em humanos, vários protocolos experimentais com modelos farmacológicos, têm sido utilizados. A rotenona é um exemplo de protótipo de como uma toxina exógena pode imitar características clínicas e patológicas da DP em um modelo animal (CANNON et al., 2009; SANDERS; GREENAMYRE, 2014).

A rotenona, é um inseticida obtido de plantas leguminosas tropicais (HISATA, 2002). É uma toxina com característica lipofílica, capaz de atravessar com facilidade membranas celulares e atua como inibidor do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (BETARBET et al., 2000; TERRON et al., 2018). Como consequência, ocorre uma perda da função mitocondrial, formação de espécies reativas e oxigênio e nitrogênio, depleção de ATP e morte celular (Figura 2). Além disso, a rotenona é capaz de induzir a ativação de mecanismos de apoptose e formação de corpúsculos de *Lewy*. A morte dos neurônios dopaminérgicos

promove a ativação de células gliais, que passam a sintetizar e secretar mediadores inflamatórios e espécies reativas, induzindo a morte de neurônios dopaminérgicos saudáveis (BOVÉ C; PERIER, 2012). Estudos demonstraram que a rotenona promove degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos, devido a inibição da formação de microtúbulos de tubulina, quando administrada de forma crônica. (BETARBET et al., 2000; SANDERS; GREENAMYRE, 2014). Além disso, a rotenona é capaz de induzir a ativação de mecanismos de apoptose, além de formação de corpúsculos de *Lewy*. A morte dos neurônios dopaminérgicos promove a ativação de células gliais, que passam a sintetizar e secretar mediadores inflamatórios e espécies reativas, induzindo a morte de neurônios dopaminérgicos saudáveis (BETARBET et al., 2000; SANDERS; GREENAMYRE, 2014). Outros estudos demonstram que a rotenona causa degeneração multissistêmica, como perda de fibras dopaminérgicas estriatais, neurônios dopaminérgicos na SNpc, fibras serotoninérgicas estriatais, neurônios de projeção do estriado, interneurônios colinérgicos estriatais, neurônios colinérgicos do núcleo tegmentar e neurônios noradrenérgicos no *locus coeruleus* (HÖGLINGER et al., 2003; ZENG et al., 2018).

Figura 2 - Mecanismos de toxicidade induzidos pela rotenona em neurônios dopaminérgicos



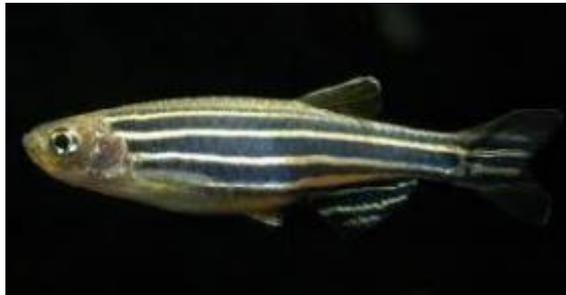
Apesar da maioria dos estudos acerca dos efeitos da rotenona utilizarem como modelo animal roedores, a utilização do peixe-zebra como modelo *in vivo* tem ganhado espaço, devido

semelhança da organização básica do sistema nervoso central com os vertebrados, incluindo humanos (BRETAUD et al., 2004; KHOTIMAH et al., 2015).

2.3 PEIXE-ZEBRA (*DANIO RERIO*)

O peixe-zebra, conhecido também como paulistinha ou *zebrafish*, é um pequeno teleósteo (mede em torno de 3-4 cm) que pertence à família Cyprinidae (Figura 3). Esse organismo é originalmente encontrado em plantações de arroz adjacentes ao rio Ganges na Índia (ENGESZER et al., 2007; SPENCE et al., 2008).

Figura 3 - Peixe-zebra (*Danio rerio*)



A descrição inicial da aplicação desta espécie em estudos científicos relacionados à biologia do desenvolvimento possibilitou grande avanço no conhecimento da embriogênese e do ciclo de vida dos vertebrados pela presença de ovos translúcidos, grande prole e desenvolvimento em aproximadamente dois meses (LELE, 1996). Introduzido na pesquisa biomédica pela primeira vez em 1981 por George Streisinger, a aplicabilidade do peixe-zebra em estudos científicos vem sendo expandida para outras áreas do conhecimento, tais como bioquímica, neurociência, farmacologia, toxicologia e comportamento, além da pesquisa psiquiátrica, devido a semelhança com os sistemas de neurotransmissores, estrutura encefálica, padrões comportamentais e organização e funcionamento de seu sistema regulador de estresse (HOWE et al., 2013; DAL SANTO et al., 2014; KALUEFF et al., 2014). Diversos sistemas de neurotransmissão amplamente estudados em mamíferos já foram identificados e descritos em peixe-zebra, tais como: dopaminérgico, GABAérgico, glutamatérgico, histaminérgico, serotoninérgico e purinérgico (RICO et al., 2011). Além disso, o estudo do genoma do peixe-zebra foi concluído em 2013 e demonstrou que 71% dos genes que codificam proteínas no genoma humano são relacionados a genes encontrados nesse animal, e que destes, 84% dos genes conhecidos por serem associados a doenças humanas possuem um gene relacionado com

o peixe-zebra (Figura 4 e Tabela 1) (HOWE et al., 2013). Estudos sugerem, que regiões específicas do peixe-zebra podem ser relacionadas e, muitas vezes são bem conservadas quando comparadas a regiões cerebrais nos seres humanos. O telencéfalo ventral do peixe-zebra, por exemplo, pode ser uma região homóloga ao estriado nos mamíferos e o sistema dopaminérgico quando caracterizado demonstrou que os neurônios dopaminérgicos são encontrados principalmente no bulbo olfatório, região pré-ótica, retina e diencéfalo ventral (SIEBEL et al., 2015).

Figura 4 - Número de genes ortólogos compartilhados entre diferentes espécies. Fonte Howe et al. (2013).

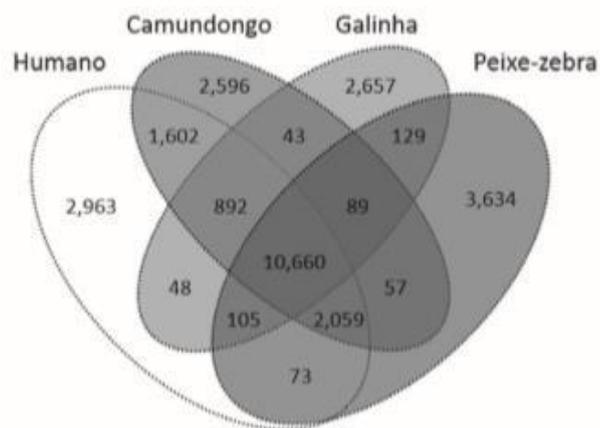


Tabela 1 - Comparação das principais características de diferentes modelos animais (SIEBEL et al., 2015)

	DROSÓFILA	CAMUNDONGO	ZEBRAFISH
FECUNDAÇÃO	Interna	Interna	Externa
DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO	Externo	Interno	Externo
EMBRIÃO	Não transparente	Não transparente	Transparente
PRODUÇÃO DE FILHOTES	100 ovos/dia	10 filhotes/2 meses	200 ovos/dia
TEMPO ATÉ IDADE REPRODUTIVA	20 dias	85 dias	60 a 90 dias
MANUTENÇÃO DIÁRIA	-	R\$ 8,00	R\$ 0,60
INVERTEBRADO OU VERTEBRADO	Invertebrado	Vertebrado	Vertebrado

Genes ortólogos à DP foram encontrados no peixe-zebra, incluindo, *pink 1*, *dj-1*, *parkin* e *lrrk 2*. Flinn et al, (2013) utilizaram um modelo de peixe-zebra mutante para *pink 1* que apresentou perda de neurônios dopaminérgicos e comprometimento da função mitocondrial. Apesar de alguns estudos demonstrarem que o *knockout* de *dj-1* não foi alterado em relação a

quantidade de neurônios dopaminérgicos no animal adulto, em embriões, apresentou maior susceptibilidade ao estresse oxidativo (Bretaud et al., 2007). Além disso, outros estudos demonstraram que a inativação da atividade de *parkin*, em peixe-zebra, diminuiu significativamente o número de neurônios dopaminérgicos ascendentes no tubérculo posterior (homólogo à substância negra em seres humanos), esse efeito foi aumentado pela exposição a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) (FLINN et al., 2009). A exposição a neurotoxinas como o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) e a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) mostraram uma diminuição na atividade locomotora e dos níveis de dopamina no cérebro de peixe-zebra (BRETAUD et al., 2004; ANICHTCHIK et al., 2008).

Além disso, o peixe-zebra adulto, apresentou alterações comportamentais, incluindo diminuição da atividade locomotora em resposta ao MPTP, enquanto as larvas demonstraram alterações dopaminérgicas e comportamentais quando eram expostas ao MPTP, rotenona e paraquat, sugerindo que o peixe-zebra poderia ser um modelo valioso para investigar os mecanismos moleculares subjacentes à neurotoxicidade de indutores de DP (BRETAUD et al., 2004; BORTOLOTTI et al., 2014).

Nesse sentido, o peixe zebra surge como organismo modelo alternativo, devido a facilidade de manutenção e manipulação em relação a outras espécies, como os roedores. Outro aspecto importante que contribui para a utilização deste modelo é o fato de que esta espécie absorve os componentes diretamente da água pelas suas brânquias, acumulando-os em diferentes tecidos, dentre os quais o sistema nervoso central (SNC), além disso possui alta capacidade de rendimento para aplicações amplas no desenvolvimento de medicamentos (NUNES et al., 2017; SONG et al., 2018).

2.4 *SPONDIAS MOMBIN* L (ANACARDIACEAE).

A *Spondias mombin* L. pertencente à família L. Anacardiaceae. e comumente é encontrada em áreas tropicais da América do Sul, África e Ásia. No Brasil, é distribuída principalmente nas regiões Norte e Nordeste e popularmente conhecida como Cajazeira, uma espécie com frutos nutritivos e saborosos e grande aceitação no mercado, sendo consumido *in natura* ou na forma de produtos, principalmente, polpa congelada, bebidas, doces, sorvetes e picolés (TIBURSKI et al., 2011; SANTOS SAMPAIO, DOS et al., 2018; LORENZI et al., 2006). Os frutos do cajá possuem altos teores de micronutrientes, como potássio, magnésio, fósforo e cobre e também apresentam quantidades significativas de compostos fenólicos e carotenoides (TIBURSKI et al., 2011; AYOKA et al., 2013; BAILÃO et al., 2015).

Suas folhas e frutos são utilizadas na medicina popular para tratar doenças inflamatórias tóxicas e sistêmicas, distúrbios gastrointestinais, desordens neurológicas, infecções bacterianas, abortivo e como antídoto para veneno de serpente (VILLEGAS et al., 1997; NWORU et al., 2007; OLUFUNKE et al., 2014). A literatura etnofarmacológica também registra a utilização da planta como anti-inflamatório, antitumoral, ansiolítico e antidepressivo (AYOKA et al., 2006; LORENZI e MATOS 2008).

Análises fitoquímicas das folhas de *S. mombin*, revelaram constituintes como carotenoides, taninos, saponinas, antraquinonas glicosiladas, alcaloides, triterpenos, compostos fenólicos e flavonoides (ABO et al., 1999; HAMANO; MERCADANTE, 2001; AYOKA et al., 2006; CORTHOUT et al., 2007; NJOKU; AKUMEFULA, 2007; SILVA et al., 2011; SILVA, DA et al., 2012; CABRAL et al., 2016). Estudos utilizando o extrato bruto aquoso e metanólico das folhas da planta, demonstraram a presença de glicosídeos. Diby et al (2012) identificaram na casca e caule a presença de quinonas e terpenos. Outros estudos com o extrato hidroetanólico dos frutos da *S. mombin* revelaram a presença de quercetinas, canferol, isoquercetinas, além do flavonoide rutina (CABRAL, 2014).

Além disso, atividades antibacteriana, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antiespasmódica, ansiolítica, anticonvulsivante e sedativa também foram demonstradas (AJAO et al., 1985; VERPOORTE et al., 2007; SAHEED et al., 2015; DE FERREYRA, 1981; JARAMILLO E AHUNADA-BARONA, 1983). Estudos anteriores relataram a extração de diferentes compostos químicos (ácido fenólico, ácido 6-alcenilsalicílico, ácido anarcárdico e derivados fenólicos) de *Spondias mombin*, que exibiram diferentes propriedades biológicas, incluindo efeitos antibacterianos, antivirais e antioxidantes quando testadas em roedores (COATES et al, 1994; CORTHOUT et al., 2007). A nível comportamental, tem sido relatado que extrato bruto de folhas de *S. mombin* modulam múltiplos comportamentos (induzidos por novidade, sedativos, antipsicóticos, antiepilépticos) em camundongos e ratos (AYOKA et al., 2013). Além disso, Sampaio e colaboradores (2018) demonstraram que o extrato hidroetanólico de *S. mombin* possui atividade ansiolítica e antidepressiva em peixe-zebra (SANTOS SAMPAIO, DOS et al., 2018).

A partir deste levantamento foi possível verificar o potencial biológico de *S. mombin* L. no tratamento de diversas enfermidades. No que diz respeito à avaliação da atividade neuroprotetora desta espécie, a literatura não dispõe de trabalhos. A investigação dessa atividade por outros modelos e a sua determinação de segurança de uso é de suma importância, tendo em vista que a espécie é largamente utilizada na medicina tradicional.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a composição fitoquímica e investigar o efeito neuroprotetor do extrato hexânico das folhas de *Spondias mombin* em modelo experimental da doença de Parkinson induzido por rotenona em peixe-zebra.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar a constituição química do extrato hexânico de *S. mombin* (EHSm);
- b) Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do EHSm;
- c) Estimar a toxicidade aguda (CL₅₀) do EHSm em peixe-zebra;
- d) Determinar os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e grupamentos sulfidríla (SH) nas amostras de homogenato de encéfalo de animais expostos a rotenona e o EHSm;
- e) Comparar a atividade de enzimas antioxidantes que atuam diretamente na remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como superóxido dismutase (SOD, catalase (CAT), glutathione transferase (GST) e glutathione (GSH) no encéfalo de peixes-zebra expostos de maneira crônica a rotenona e o EHSm;
- f) Analisar a atividade da NADPH oxidase e produção de ânion superóxido em encéfalo de peixe-zebra exposto cronicamente ao rotenona e ao EHSm;
- g) Examinar a recaptação de dopamina no homogenato de encéfalo peixe-zebra exposto cronicamente a rotenona e ao EHSm;
- h) Explorar o efeito ansiolítico-símile e comportamental locomotor em peixes-zebra expostos cronicamente a rotenona e ao EHSm por meio dos testes de novel tank e claro escuro.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A coleta das folhas de *Spondias mombin* foi realizada em julho de 2014, no município de Cajazeirinhas – PB (S6°58.34.558 – W37°48.21.424). Em seguida, uma amostra representativa da coleta foi depositada e identificada no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônômico de Pernambuco, sob o registro de n° #89987.

4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DE S. MOMBIN (EHSM)

Após a coleta, as folhas de *S. mombin* foram secas em temperatura ambiente por 15 dias e trituradas. Aproximadamente 300 g de folhas foram submetidas à extração por maceração, com hexano como extrator líquido na proporção de 1:10. O procedimento foi realizado duas vezes consecutivas, cada uma com duração de 12h. Após filtração no final de cada processo de extração, o solvente foi completamente removido do extrato por meio de um evaporador rotativo a pressão reduzida, com temperatura entre 65-70 °C. Ao término do processo foram obtidos 12 g de extrato com rendimento de 4,0% (g/g). O extrato hexânico de *S. mombin* (EHSm) foi submetido à: i) identificação de compostos químicos; ii) avaliação antioxidante *in vitro*; e iii) análise comportamental e antioxidante *in vivo*.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DO EHSM

4.3.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa (CG-EM) do EHSm

A determinação dos compostos presentes no extrato foi realizada por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-EM - Agilent Technologies GC 7890B - MSD 5977A) adaptado de (LIGIERO et al., 2009), utilizando 10 mg.mL⁻¹ de amostra/solução de hexano. A temperatura inicial do forno foi ajustada em 40 °C com uma rampa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ a 190 °C, depois uma rampa de 50 °C.min⁻¹ a 240 °C, sem tempo de espera; a temperatura do injetor foi ajustada para 250 °C, com 1 µL da amostra sendo injetada e hélio como gás de arraste ajustado para 1 mL.min⁻¹. O EM foi operado usando ionização por impacto de elétrons (70 eV) na faixa de 50-500 m/z. A temperatura da linha de transferência EM foi fixada em 150 °C e a temperatura da fonte de íons foi fixada em 230 °C.

Os componentes químicos presentes nos extratos foram identificados por comparação com a biblioteca do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) do software do equipamento (Agilent P/N G1033A). As quantidades relativas de cada componente individual foram calculadas usando suas respectivas áreas de pico no cromatograma.

4.3.2 Cromatografia Líquida com detecção de matriz de diodo (CLAE-DAD)

As análises CLAE-DAD foram realizadas usando um Shimadzu (LCMS-2020), modelo SPD-M20A, com um detector de matriz de diodo de alto desempenho. As análises cromatográficas de fase reversa foram realizadas em condições de gradiente, utilizando uma coluna C18 (4,6 × 250 mm; Macron, Center Valley, Pensilvânia, EUA) embalada com partículas de 5 µm de diâmetro. A fase móvel foi uma mistura de metanol (A) e ácido fórmico aquoso a 5% (B). O gradiente de concentrações foi aplicado ao longo de 65 min a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min da seguinte forma: primeiro 5-15% A ao longo de 10 min, em seguida, uma faixa de 35 a 50% A ao longo de 15 min e, finalmente, a concentração de A mudou de 50 a 100% em 10 min (Gonçalves et al., 2005). Os perfis cromatográficos foram registrados a 349 nm para a quercitrina, a 355 nm para a rutina e a 379 nm para a quercetina. Soluções padrão de estoque foram preparadas em concentrações que variaram de 0,030 a 0,250 mg/mL usando a fase móvel de CLAE. Os picos da cromatografia foram confirmados comparando seu tempo de retenção com padrões de referência e por espectros DAD (200-600 nm). Todas as operações de cromatografia foram realizadas à temperatura ambiente.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO EHSM

4.4.1 Avaliação da atividade do DPPH⁺ (2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato) e ABTS + (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) no EHSm

A atividade antioxidante do EHSm foi medida pelo método de sequestro de radical livre por meio da doação de hidrogênio pelo radical estável DPPH (OLIVEIRA DE VERAS et al., 2020), e pelo ensaio ABTS baseado na geração do radical cromóforo catiônico obtido da oxidação de ABTS por persulfato de potássio (DE VERAS et al., 2019). Ambas as medidas foram realizadas em triplicata e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de DPPH e ABTS removidos, usando Trolox[®] como padrão um análogo da vitamina E (Trolox, Merck, São Paulo, Brasil). O percentual de inibição (I%) foi calculado

usando a equação: $I\% = [(Abs0 - Abs1)/Abs0] \times 100$, onde Abs0 é a absorbância do controle e Abs1 é a absorbância do EHSm.

4.4.2 Avaliação da capacidade antioxidante total (CAT) do EHSm

A CAT foi determinada pelo método do fosfomolibdênio (COSTA et al., 2011). O padrão de ácido ascórbico foi utilizado como referência e a CAT foi expressa como equivalente do ácido ascórbico. O resultado foi calculado usando a fórmula: $CAT (\%) = [(Amostra\ de\ Abs - Branco\ de\ Abs) / (\acute{a}cido\ ascórbico\ de\ Abs - Branco\ de\ Abs)] \times 100$. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.3 Avaliação do poder de redutor do EHSm

O poder redutor do EHSm foi determinado de acordo com o método de MELO-SILVEIRA et al. (2014). As amostras foram diluídas em metanol e então misturadas com 2,5 mL de tampão fosfato (0,2 M, pH 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio [$C_6N_6FeK_3$] a 1%. A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min. O ácido ascórbico foi usado como referência. O poder redutor (%) foi calculado pela absorbância da amostra e razão de controle: $\% I = [(controle\ Abs - amostra\ Abs) / controle\ Abs] \times 100$. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados peixe-zebra (*Danio rerio*) adultos (com 4-6 meses de idade) de ambos os sexos (50:50). Os animais em um total de 294, foram obtidos de colônia proveniente de estabelecimento comercial e foram mantidos no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Produtos Bioativos, da UFPE, em aquários de 50 L com água filtrada, salinizada e continuamente aerada, em uma proporção de 4 animais por litro. A temperatura da água permaneceu regulada em 25 ± 1 °C e os peixes foram mantidos em ciclo de claro-escuro de 14h/10h. Os peixes foram alimentados com ração industrializada flocada (TetraMin, Carolina do Norte, EUA) três vezes ao dia e seu bem-estar guiado pelo preceito da redução, substituição e refinamento, visando a garantir o melhor aproveitamento e uso de menor número de animais. Para melhor representar a heterogeneidade da população foram utilizados peixe-zebra do tipo selvagem, devido à sua variabilidade genética aumentada. O tratamento dos animais foi

realizado de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do National Institutes of Health (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011).

Os protocolos experimentais com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA da UFPE e Unochapecó, sob os protocolos 0013/2016 e 012/2020 respectivamente (Anexo I).

4.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.6.1 Protocolo para avaliação da toxicidade aguda (CL₅₀)

Esse protocolo seguiu as normas estabelecidas pelo protocolo 203 da OECD (2019). Após o período de adaptação de 15 dias, os animais foram divididos aleatoriamente em 9 grupos contendo 12 animais cada, e transferidos para tanques de 5 L (29 x 16 x 15 cm) de água. Os grupos foram expostos por um período de 24, 48, 72 e 96 horas em um sistema semiestático, a seis diferentes concentrações do EHSm (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 100 mg/L), um grupo com dimetilsulfóxido (DMSO 0,1% - grupo veículo), e ao grupo controle (água).

Para o preparo do extrato foi necessária uma solução mãe na concentração de 10 mg/mL, utilizando o DMSO 0,1% para melhor solubilização. A ROT também era adicionada aos aquários a partir de uma solução mãe de 150µg/µL.

Os animais foram mantidos em jejum durante a realização do teste, conforme estabelece o protocolo OECD 203 (2019). A temperatura foi mantida em 25 ± 1 °C. Parâmetros de pH, temperatura, alterações comportamentais e registro do número de mortos foram observados diariamente.

Após o término das 96h, os animais foram anestesiados (tricaina, 250 mg/L) e eutanasiados de acordo com normas específicas e visando minimizar desconforto e sofrimento (WESTERFIELD, 2000). O valor estimado da CL₅₀ de 96 h foi calculado usando o programa US EPA Probit 1,5 versão gratuita (US EPA, 1992).

4.6.2 Protocolo de exposição do EHSm per se e ROT

Em um primeiro momento, os animais foram divididos em 5 grupos (em tanques de 20 L) para avaliação *per se* do EHSm. As concentrações de EHSm utilizadas foram baseadas em estudos anteriores (BRITO et al., 2018; DOS SANTOS SAMPAIO, et al., 2018) e os animais

foram expostos por um período de 96 h as diferentes concentrações de extrato (conforme descrito abaixo). Cada grupo foi composto por um n=6 a partir de um *pool* de 4 animais.

- a) GRUPO 1: controle (água);
- b) GRUPO 2: EHSm 1 mg/L;
- c) GRUPO 3: EHSm 5 mg/L;
- d) GRUPO 4: EHSm 15 mg/L;
- e) GRUPO 5: EHSm 25 mg/L;

Após o período de exposição os animais foram eutanasiados com triclaína (250 mg/L).

Num segundo momento, foi realizada avaliação da rotenona baseada na metodologia descrita por BRETAUD et al (2004), conforme descrito abaixo. A exposição a rotenona foi realizada num período de 30 dias e cada grupo foi composto por um n=6 a partir de um *pool* de 4 animais.

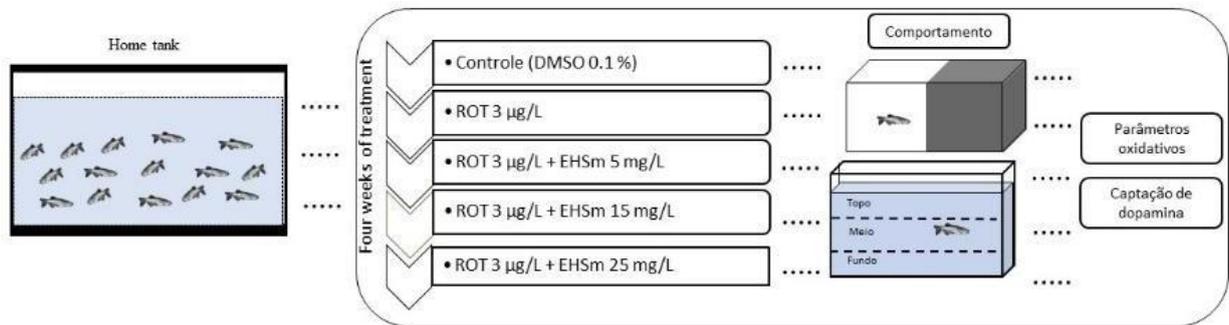
- a) GRUPO 1: controle água;
- b) GRUPO 2: DMSO 0,1% (veículo da rotenona);
- c) GRUPO 3: controle rotenona 3 µg/L;

Durante o período de tratamento (96h e 30 dias), todos os parâmetros de pH, temperatura e O₂ foram monitorados. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro 14h/10h e temperatura de 25 ± 1 °C. Os animais eram alimentados 3 vezes ao dia, com ração flocada. A fim do tratamento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e em seguida anestesiados (triclaína 250 mg/L) e eutanasiados por meio de decapitação.

4.6.3 Protocolo exposição a ROT e EHSm

Após a avaliação do EHSm *per se*, e a escolha da concentração de rotenona que seria utilizada, os animais foram novamente separados em grupos e tratados, por meio de imersão em água, conforme (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Os animais foram transferidos do tanque doméstico para tanques de teste (20 L) por 4 semanas, com aplicação diária de ROT e EHSm. Ao término do período de exposição, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de atividade locomotora/exploratória e tipo ansiolítica e, em seguida anestesiados (triclaína 250 mg/L) e eutanasiados por meio de decapitação para as demais análises bioquímicas (n=6 – a partir de um *pool* de 4 animais).

Figura 5 - Esquema mostrando o desenho experimental.



4.7 AVALIAÇÕES DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

4.7.1 Avaliação da atividade locomotora com novel tank

Transcorridos os 30 dias de exposição, os animais foram submetidos imediatamente e individualmente ao teste novel tank (NTT). O NTT consistia de um tanque de 2,7 L (24x8x20 cm) com água até a marca de 15 cm (MOCELIN et al., 2015). O comportamento foi registrado por 6 min e a temperatura da água mantida a 25 ± 1 °C (PANCOTTO et al., 2018). Cada grupo foi constituído por um n= 20-24 peixes-zebra e um código cego foi obtido para cada grupo experimental. Os animais foram testados em 4 dispositivos ao mesmo tempo (um desenho de blocos aleatórios foi realizado para que um animal de cada grupo experimental fosse testado ao mesmo tempo) e a ordem do tanque entre os grupos foi aleatória). Após a realização dos testes comportamentais, os arquivos de vídeo foram codificados e o examinador responsável pela análise comportamental desconhecia o grupo experimental ao qual cada animal pertencia. As análises comportamentais foram realizadas usando o software de rastreamento ANY-Maze (Stoelting Co., Illinois, EUA). O aparelho foi virtualmente dividido em três zonas horizontais iguais (topo, meio e fundo). Os parâmetros comportamentais analisados foram: distância total percorrida (m), número de travessias, entradas no topo da área e tempo gasto no topo da área (s).

4.7.2 Avaliação da atividade tipo ansiolítica com claro/escuro

O teste claro/escuro foi realizado de acordo com GEBAUER et al. (2011) e MARCON et al. (2019). Cada animal foi cuidadosamente transferido para o aparelho e testado individualmente (n = 12/grupo). O aparelho consistia em um tanque de vidro (18x9x7 cm)

dividido em duas partes, um compartimento preto e um compartimento branco, com uma divisória guilhotina deslizante (9x7 cm) entre os dois compartimentos de tamanhos iguais com 3 cm de água. A temperatura da água foi mantida em 25 ± 1 °C e foi alterada entre cada grupo experimental. A ordem de exposição dos animais ao tanque foi aleatória entre os tratamentos. Os experimentadores desconheciam o tratamento. O tempo de permanência no compartimento de luz e o número de travessias entre os compartimentos foram registrados por 5min e posteriormente analisados por meio do software Boris (Università Degli Studi di Torino, Torino, Itália).

4.8 ANÁLISE DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.8.1 Preparo e homogeneização do tecido

As análises bioquímicas foram realizadas com os mesmos animais submetidos ao NTT e teste claro escuro. Um pool de quatro cérebros inteiros foi dissecado para preparar um homogenato para análises de estresse oxidativo (n=6 por grupo). As amostras foram homogeneizadas em 1 mL de solução salina tampão de fosfato (PBS; pH 7,4, NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 10,1 mM, e KH_2PO_4 1,76 mM) e imediatamente centrifugadas a $800 \times g$ por 5 min em uma centrífuga micro refrigerada (VS-15000 CFNII, Vision Scientific, Daejeon, Coreia do Sul). Os sobrenadantes foram armazenados a -80 °C para posterior análise bioquímica. Todas as medidas bioquímicas foram realizadas em triplicata. Os detalhes de cada procedimento foram descritos em estudos anteriores (DAL SANTO et al., 2014; AGOSTINI et al., 2018; ALEXANDRE et al., 2019).

4.8.2 Peroxidação lípidica (TBARS)

Para a dosagem da peroxidação (TBARS) o protocolo foi baseado em ESTERBAUER e CHEESEMAN (1990). Uma curva de calibração foi estabelecida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que os sobrenadantes (300 µg de proteína). Resumidamente, o homogeneizado foi precipitado por meio de uma reação ácida com ácido tricloroacético (TCA) a 10% com sulfato de sódio adicionado ao sobrenadante na proporção 1:1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) 0,67% na proporção de 1:1(v/v). A mistura foi levada a um banho fervente durante 2 horas e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. A absorbância obtida através da coloração rósea

resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia). Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1,1,3,3-tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol de TBA-RS.mg de proteína⁻¹ (ESTERBAUER e CHEESEMAN, 1990).

4.8.3 Avaliação de conteúdo de grupamento sulfidril-SH (tiol)

Para determinação do conteúdo de grupos sulfidril, os cérebros totais foram homogeneizados em tampão PBS (pH 7,4). Uma alíquota da amostra (24 µg de proteína) foi incubada em tampão PBS com EDTA 1mM (pH 7,4). A oxidação dos tióis livres da amostra leva à formação de pontes dissulfeto. Após foi adicionado o ácido ditionitrobenzóico (DTNB), reagente de Ellman, que foi reduzido pelos tióis não oxidados, gerando um derivado amarelo (ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico, TNB), que foi lido espectrofotometricamente a 412 nm (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia). Os resultados foram expressos em nmol de TNB.mg de proteína⁻¹ (AKSENOV e MARKESBERY, 2001).

4.8.4 Determinação dos níveis da glutathiona (GSH)

Os níveis de GSH foram determinados de acordo com SEDLAK e LINDSAY (1968), com pequenas modificações. Os níveis de GSH foram avaliados pela quantificação de grupos sulfidril não proteicos em amostras de homogenato (48µg de proteína) que foram submetidas à precipitação de proteínas por adição de TCA (20%), seguida de centrifugação a 800 × g por 10 min. Os sobrenadantes foram misturados com uma solução contendo tampão Tris-EDTA, TCA (10%) e DTNB (4 mM). Em seguida a placa contendo as reações foi incubada por 15 minutos e efetuou-se a leitura em espectrofotômetro Varioskan Flash, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia. A L-cisteína foi usada para construir a curva padrão e os resultados expressos como µg GSH/mg de proteína.

4.8.5 Avaliação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD em cérebro total foi determinada de acordo com BANNISTER e CALABRESE (1987) com algumas modificações. Inicialmente, foram realizadas leituras da auto-oxidação da adrenalina. Após, foram adicionados à amostra (40µg de proteína), catalase 10 mM, tampão glicina 50 mM e adrenalina 60 mM, e ao branco foi adicionada adrenalina 60

mM. A atividade enzimática foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente em 480 nm à temperatura ambiente em espectrofotômetro Varioskan Flash, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia. A atividade da enzima foi expressa em unidade de atividade da SOD por mg de proteína.

4.8.6 Avaliação da atividade enzimática da catalase (CAT)

Esta atividade enzimática da catalase (EC 1.11.1.6) em cérebro total foi determinada por meio do método de AEBI (1984). À amostra contendo 32µg de proteína previamente homogeneizada, foi adicionado Triton 0,1% seguido de agitação. Esta mistura foi conservada em gelo durante 15 minutos. Ao tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, foi adicionado H₂O₂ 30% (v/v). Este meio foi colocado em cubeta de quartzo e o aparelho estabilizado contra um branco corrido separadamente de tampão fosfato. Após adição da amostra, foi realizada a leitura da queda da absorbância do H₂O₂ a 240 nm, à temperatura ambiente, durante 180 segundos em espectrofotômetro Varioskan Flash, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia. Para o cálculo, utilizou-se o coeficiente de extinção do H₂O₂ de 39,4 mM. Os resultados da atividade enzimática foram expressas em unidade de atividade da catalase por mg de proteína.

4.8.7 Avaliação da atividade enzimática da Glutathione-S-Transferase (GST)

A atividade da glutathione-S-transferase é diretamente proporcional a taxa de formação do composto DNP-SG (dinitro fenil S glutathione), podendo desta forma ser medida por meio do monitoramento da taxa de formação do composto. Em uma cubeta de quartzo de 1 mL, adicionou-se a amostra (80 µg de proteína) ao tampão fosfato (0,1 M) e EDTA (1 mM), amostra, GSH (1 mM) e CDNB (1 mM). A absorbância (340 nm) foi registrada por um período de aproximadamente 3 minutos com controle da temperatura (30°C), em espectrofotômetro Varioskan Flash, Thermo Scientific, (Vantaa, Finlândia). Os resultados foram expressos em U/mg proteína. Uma unidade de atividade enzimática da GST foi definida como a quantidade necessária para catalisar a formação de quanto 1 µmol do composto DNP-SG por minuto. (HABIG, PABST e JAKOBY, 1974).

4.8.8 Produção de ânion superóxido (O_2^-) e atividade da oxidase de dihidronicotinamida-adenina fosfato de dinucleotídeo (NADPH)

Para as análises de NADPH oxidase e produção de ânion superóxido (O_2^-), um pool de dois cérebros de peixe-zebra inteiros foi usado para preparar um homogenato. Neste caso, os cérebros inteiros foram dissecados e o homogenato preparado em 0,5 mL de tampão de lise RIPA (NaCl 150 mM, triton X-100 1%, desoxicolato de sódio 0,5%, dodecil sulfato de sódio (SDS, 0,1%) e base de trizma 50 mM, pH 8,0); contendo cloridrato de fluoreto de 4- (2-aminoetil) benzenossulfonil (AEBSF, 2 mM, EDTA 1 mM, bestatina 130 μ M, E-64 14 μ M, leupeptina 1 μ M e aprotinina 0,3 μ M).

A formação de O_2 foi avaliada pelo método de quimioluminescência intensificada por lucigenina. Os homogenatos de tecido foram centrifugados a $12.000 \times g$ a $4^\circ C$ em uma microcentrífuga refrigerada por 12 min. O sobrenadante foi adicionado ao tampão fosfato salino (pH 7,4) na proporção de 0,1 mL: 1 mL fornecido com NADPH 100 μ M. A quimioluminescência foi medida em um luminômetro (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia) em intervalos de 30 s por 5 min a $37^\circ C$, antes e após a adição de 10 μ M de lucigenina. A produção basal de superóxido foi medida na ausência de NADPH. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9 ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE DOPAMINA

Nas análises de captação de dopamina, cada cérebro inteiro foi excisado em placas de Petri com solução salina balanceada de Hank (HBSS: NaCl 137 mM; Na_2HPO_4 0,63 mM; $NaHCO_3$ 3,0 mM; KCl 5,36 mM; KH_2PO_4 0,44 mM; $CaCl_2$ 1,26 mM; $MgSO_4$ 0,90 mM; glicose 5,55 mM) e ácido 4- (2-hidroxietil) piperazina-1-etanossulfônico, N- (2-hidroxietil) piperazina-N'- (ácido 2-etanossulfônico) - HEPES, 20 mM - pH 7,2). Cada cérebro inteiro foi separado e transferido individualmente para placas de cultura de 24 poços contendo 0,5 mL de tampão HBSS-HEPES e todas as placas foram mantidas a $37^\circ C$ ao longo dos experimentos (ALEXANDRE et al., 2019).

O ensaio de captação de dopamina foi realizado conforme descrito anteriormente por RICO et al. (2010) com pequenas modificações (ALEXANDRE et al., 2019). A captação total de dopamina foi medida pela adição de 20 μ L de 0,35 μ Ci mL⁻¹ L⁻¹ [3H] solução marcada de dopamina correspondendo a 10 nM L [3H] dopamina e 0,75 nM de dopamina não marcada no

meio de incubação aquecido a 37 °C. Para identificar a condição em que a reação foi linear com o tempo, as medidas foram realizadas nos seguintes tempos: 3, 5, 7, 10 e 15 min. A radioatividade foi medida com líquido de cintilação.

4.10 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (BRADFORD, 1976). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas por meio da medida da absorbância do complexo proteína-corante. Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA (2 mg/mL) foi utilizada como padrão.

4.11 ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram analisadas pelos testes D'Agostino-Person e Levene, respectivamente. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). As médias foram comparadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, e os grupos foram considerados diferentes em $p < 0,05$. Cada parâmetro foi avaliado em pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata.

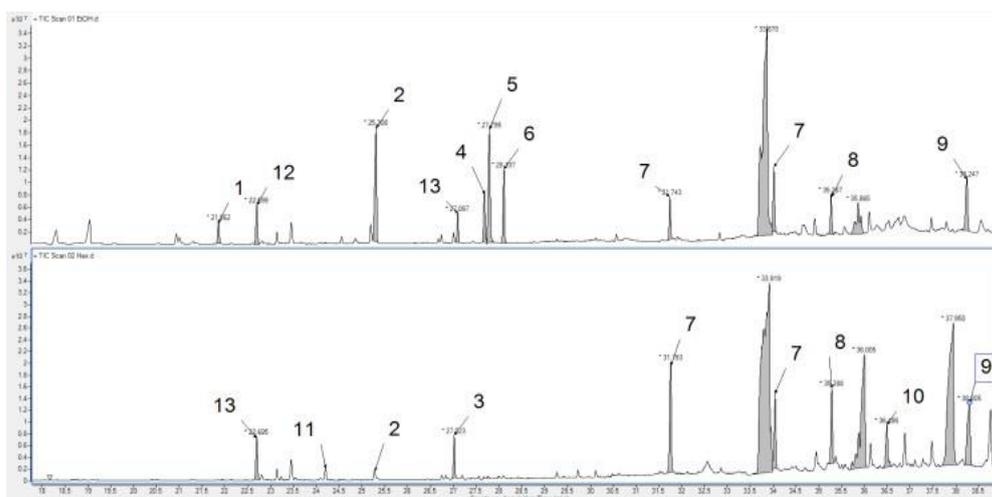
5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EHSm

5.1.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa (CG-EM) do EHSm

Na avaliação do EHSm pelo CG-EM, foi possível verificar a presença do ciclogalifaraol (13,88%) como componente majoritário (Figura 6). Os outros componentes identificados foram dl- α -tocoferol (8,08%), esqualeno (5,21%), δ -tocoferol (3,69), 4,8,12-trimetiltridecano-4-olida (2,97%), palmitato de metila (0,82%), palmitato de etila (0,73%) e fitol (2,61%).

Figura 6 - Identificação por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa dos compostos químicos do EHSm



Compostos	Marcador	EHSm (%)	EtOH (%)
4,8,12-trimetiltridecano-4-olida	13	2,97	1,63
palmitato de metila	11	0,82	-
palmitato de etila	2	0,73	-
fitol	3	2,61	-
ciclogalifaraol	7	13,88	6,88
esqualeno	8	5,21	2,04
A-tocoferol	10	3,69	-
dl- α -tocoferol	9	8,08	4,95
	Total	37,99	15,5

5.1.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do EHSm

O perfil de CLAE do EHSm demonstrou a presença de compostos fenólicos como a quercitrina (6,54 mg/g) e principalmente a rutina (8,83 mg/g), em grandes quantidades conforme vistos na Tabela 2.

Tabela 2 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do EHSm

Compostos	[mg/g]	Curva de calibração
quercitrina	6,542	4.51016e+007*x-346705
rutina	8,834	6.49075e+007*x-226120

5.2 AVALIAÇÃO ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO (DPPH, ABTS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL E PODER REDUTOR) DO EHSM

A concentração inibitória 50% (CI₅₀) do EHSm nas atividades de eliminação do radical DPPH foi 521,38 ± 7,45 µg/mL, e o do Trolox (controle positivo) foi 78,86 ± 1,80 µg/mL. A atividade de eliminação de radical ABTS mostrou um CI₅₀ de 1021,38 ± 70,02 µg/mL para EHSm e 257,34 ± 7,31 µg/mL para Trolox. A potência do EHSm foi 4 e 6 vezes menor no ABTS e DPPH, respectivamente, quando comparado ao Trolox.

O EHSm apresentou valores de CI₅₀ de 1.291,12 ± 16,10 e 1.568,65 ± 16,15 µg/mL nos testes de Capacidade antioxid. total e poder redutor, respectivamente. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo e apresentou o CI₅₀ de 500,00 ± 0,00 µg/mL para ambos os testes. A EHSm foi aproximadamente 2,6 e 3,1 vezes menor do que o ácido ascórbico respectivamente para Capacidade antioxid. total e poder redutor.

5.3 TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO DE EHSM EM PEIXE-ZEBRA

Na exposição do peixe-zebra as diferentes concentrações do EHSm, obteve-se uma CL₅₀ de 58,42 mg/L em 96h. Durante o período de exposição (96 h) não houve mortalidade nos grupos tratados com EHSm 10, 20, 30 e 40 mg/L e nenhuma anormalidade visível foi observada com relação a aparência, equilíbrio, locomoção e comportamento de natação.

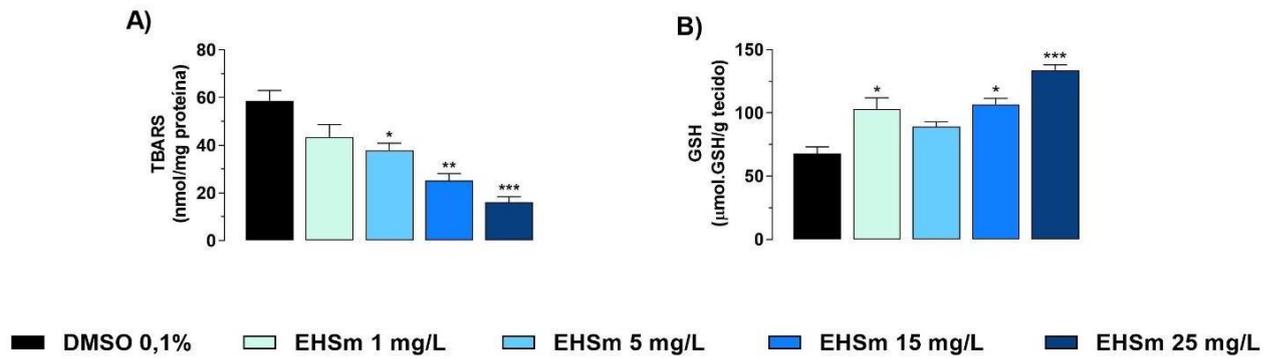
Por outro lado, a taxa de mortalidade para os grupos expostos a 50 mg/L foi de 16,67%, com a mortes nas primeiras 48 horas e depois com 72 horas. No grupo de 60 mg/L, ocorreram 11 mortes centro das primeiras 24 horas e uma morte dentro das 72 horas seguintes. No grupo de 100 mg/L a mortalidade de 100% ocorreu nas primeiras 24 horas. Nos grupos de 60 e 100 mg/L observamos uma redução da locomoção e do comportamento natatório em relação ao grupo controle. Durante o período de tratamento, não foram observadas alterações significativas nas variáveis físicas e químicas da água que poderiam ter interferido nos resultados obtidos.

5.4 AVALIAÇÃO PARÂMETROS OXIDATIVOS EHSM PER SE E ROT

5.4.1 Avaliação do efeito de parâmetros oxidativos do extrato hexânico de *Spondias mombin* L. (EHSm) em peixe-zebra (per se).

Para avaliar o efeito do extrato *per se* sobre parâmetros oxidativos, foi avaliado a peroxidação lipídica por meio dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e os níveis de GSH. Em relação aos níveis de TBARS (A), foi observado uma diminuição significativa nas concentrações de extrato 5, 15 e 25 mg/L (35,36, 56,97 e 72,56%; $p=0,009$, $p=0,0001$ e $p<0,0001$, respectivamente) quando comparado ao grupo controle. Os níveis de GSH (B), apresentaram um aumento de 152,14% ($p=0,003$), 157,59% ($p=0,0015$) e 197,40% ($p<0,0001$) nos grupos tratados com extrato nas concentrações de 1, 15 e 25 mg/L, respectivamente, em relação ao controle (Figura 7).

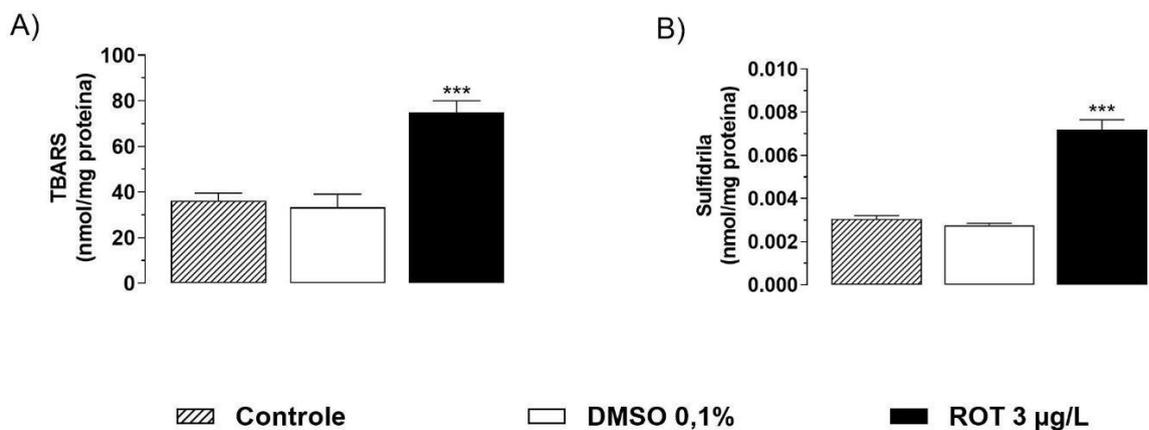
Figura 7 - Efeitos do extrato hexânico de *S. mombin* (EHSm) nos níveis espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, A) e níveis de glutathiona (GSH, B) no cérebro do peixe-zebra. Os dados são apresentados como média \pm Erro padrão da média \pm E.P.M. $n=6$. Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. * $p<0,05$; ** $p<0,001$; *** $p<0,0001$ comparado ao grupo controle (DMSO 0,1%).



5.4.2 Avaliação do efeito da rotenona sobre a peroxidação lipídica (TBARS) e grupamentos sulfidríla (SH)

Ao avaliar os níveis de peroxidação lipídica em tecido cerebral do peixe-zebra, foi observado que somente o grupo rotenona (ROT, 3 μg/L) apresentou aumento significativo (206,13%, $p < 0,0001$) nos níveis de TBARS. O mesmo grupo ROT aumentou significativamente (210%, $p < 0,0001$), o número de grupamentos sulfidríla. O grupo veículo (DMSO 0,1%) não apresentou diferença significativa ($p = 0,84$) quando comparado ao grupo controle (Figura 8).

Figura 8 - Avaliação do efeito da rotenona (ROT) nos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, A) e avaliação do conteúdo de grupamentos sulfidríla (SH, B). DMSO: dimetilsulfóxido. Os dados são apresentados como média ± Erro padrão da média ± E.P.M. $n = 6$. Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle.



5.4.3 Avaliação dos efeitos da rotenona na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), níveis de glutathiona (GSH) e atividade glutathiona transferase (GST).

A avaliação das defesas antioxidantes foi realizada pela análise das enzimas SOD, CAT, GST e níveis GSH. Verificou-se que a ROT (3 µg/ L) reduziu significativamente os valores das enzimas SOD (54,75%) e níveis de GSH (73,96%). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas na atividade das enzimas CAT e GST entre os grupos avaliados. Para as enzimas SOD, CAT, GST e níveis de GSH, o grupo tratado com o veículo dimetilsulfóxido (DMSO 0,1%) não diferiu do grupo controle.

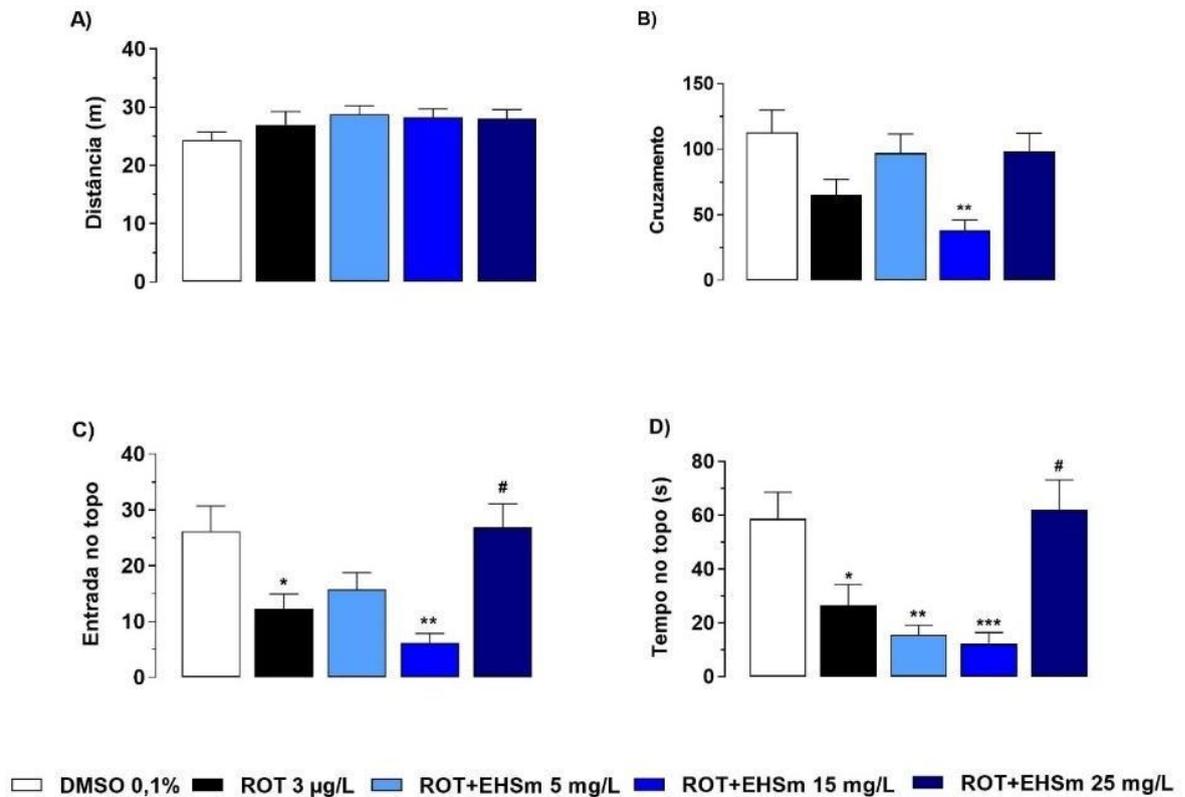
5.5 AVALIAÇÃO DO EHSM SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM PEIXE-ZEBRA EXPOSTOS A ROT

5.5.1 Teste de novel tank (NTT)

Para avaliar o perfil exploratório/locomotor em peixe-zebra, foi utilizado o teste NTT (Figura 9). Durante o período de tratamento por quatro semanas, houve 4 mortes (15°, 18°, 21° e 24° dia) no grupo ROT e os animais foram substituídos. Nos demais grupos nenhuma morte foi registrada. A exposição a ROT não induziu mudanças significativas na distância total percorrida ($p=0,78$; **Fig. 9A**) ou número de cruzamentos ($p=0,11$; **Fig. 9B**). A ROT diminuiu o número de entradas no topo da área em 53,5% ($p=0,03$; **Fig 9C**), e o tempo gasto na área superior do tanque em 54,7% ($p=0,04$; **Fig 9D**). A concentração mais alta de EHSm (25 mg/L) foi, significativamente, eficaz para prevenir as alterações induzidas por ROT em termos de entradas ($p=0,03$; **Fig. 9C**) e tempo gasto na área superior do tanque ($p=0,01$; **Fig. 9D**). O grupo ROT + EHSm (15 mg/L) reduziu o número de travessias em 66,5% ($p=0,001$; **Fig 9B**), o número de entradas na área superior em 76,5% ($p=0,0004$; **Fig 9C**) e o tempo na área superior em 79,2% ($p=0,0004$; **Fig 9D**). No entanto, essas respostas não foram estatisticamente diferentes daquelas obtidas com o grupo da rotenona.

Figura 9 - Avaliação do efeito da rotenona (ROT) e extrato heânico de *S. mombin* (EHSm) sobre a distância total percorrida (A), número de cruzamentos (B), número de entradas (C) e tempo gasto na área superior do aparato (D) no novel tank. Os dados são apresentados como média ± Erro padrão da média ± E.P.M. n=20-24. Análise de

Variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$ comparado ao grupo controle, # $p < 0,05$ comparado ao grupo rotenona.

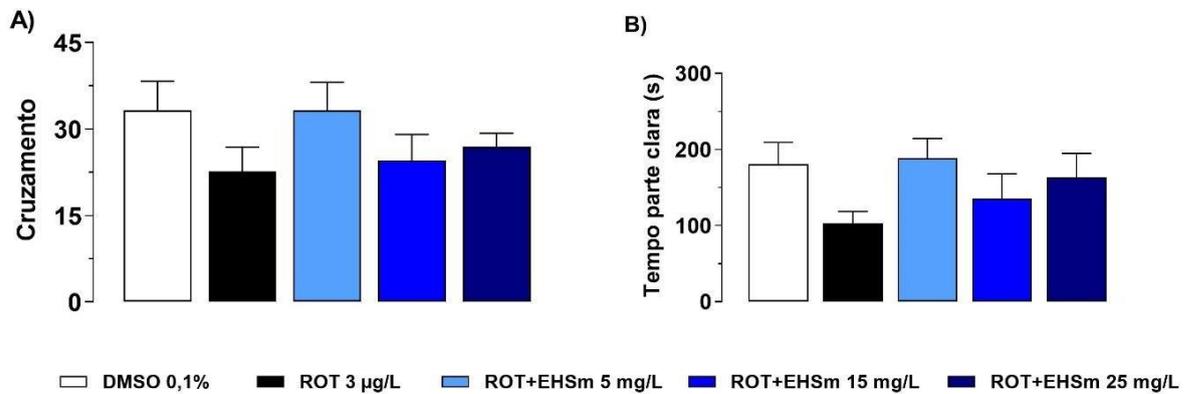


5.5.2 Teste de Claro/escuro (LDT)

Os grupos expostos a ROT (3 µg/L) e ROT + EHSm (5, 15 e 25 mg/L) não apresentaram diferença estatística ($p=0,471$ e $p>0,999$; $p=0,613$ e $p=0,834$ respectivamente) com grupo controle nos parâmetros de número de cruzamentos no tanque e no tempo de permanência no lado claro do aparato LDT (Figura 10).

Figura 10 - Avaliação dos efeitos da rotenona (ROT) e do extrato hexânico de *S. mombin* (EHSm) no tempo de permanência na parte clara (A) e número de travessias (B) no teste claro/escuro. Os dados são apresentados como

média \pm Erro padrão da média \pm E.P.M. n=12. Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.



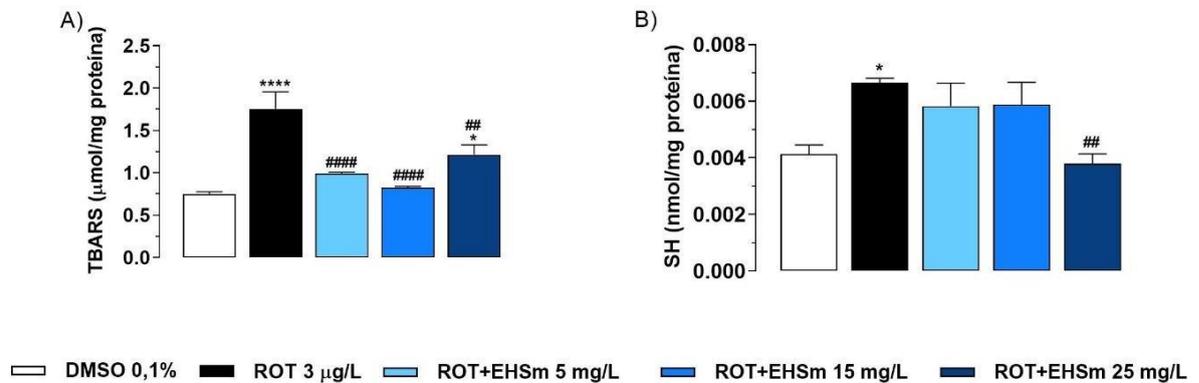
5.6 AVALIAÇÃO DO EHSM SOBRE PARÂMETROS OXIDATIVOS EM ENCÉFALO DE PEIXE-ZEBRA TRATADOS COM ROTENONA.

5.6.1 Peroxidação lipídica (TBARS) e grupamentos sulfidríla (SH)

A figura 11 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** mostra os efeitos de ROT (3 µg/L) e ROT + EHSm (5, 15 e 25 mg/L) no estado oxidativo do peixe-zebra. Os níveis de TBARS (Figura 11-A) aumentaram significativamente no grupo ROT (134,6%; $p < 0,0001$), e essa alteração foi evitada por todas as doses de EHSm. Os níveis de sulfidríla aumentaram significativamente no grupo ROT (61,3%; $p = 0,026$), no entanto, apenas a maior concentração do extrato (25 mg/L) reverteu o efeito (Figura 11-B).

Figura 11 - Efeitos de rotenona (ROT) e do extrato hexânico de *S. mombin* (EHSm) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, A) e grupamentos sulfidríla (SH, B) no cérebro do peixe-zebra. Os dados são apresentados como média \pm Erro padrão da média \pm E.P.M. n=6. Análise de Variância (ANOVA) de uma via

seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo de controle, ## $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$ comparado ao grupo ROT.

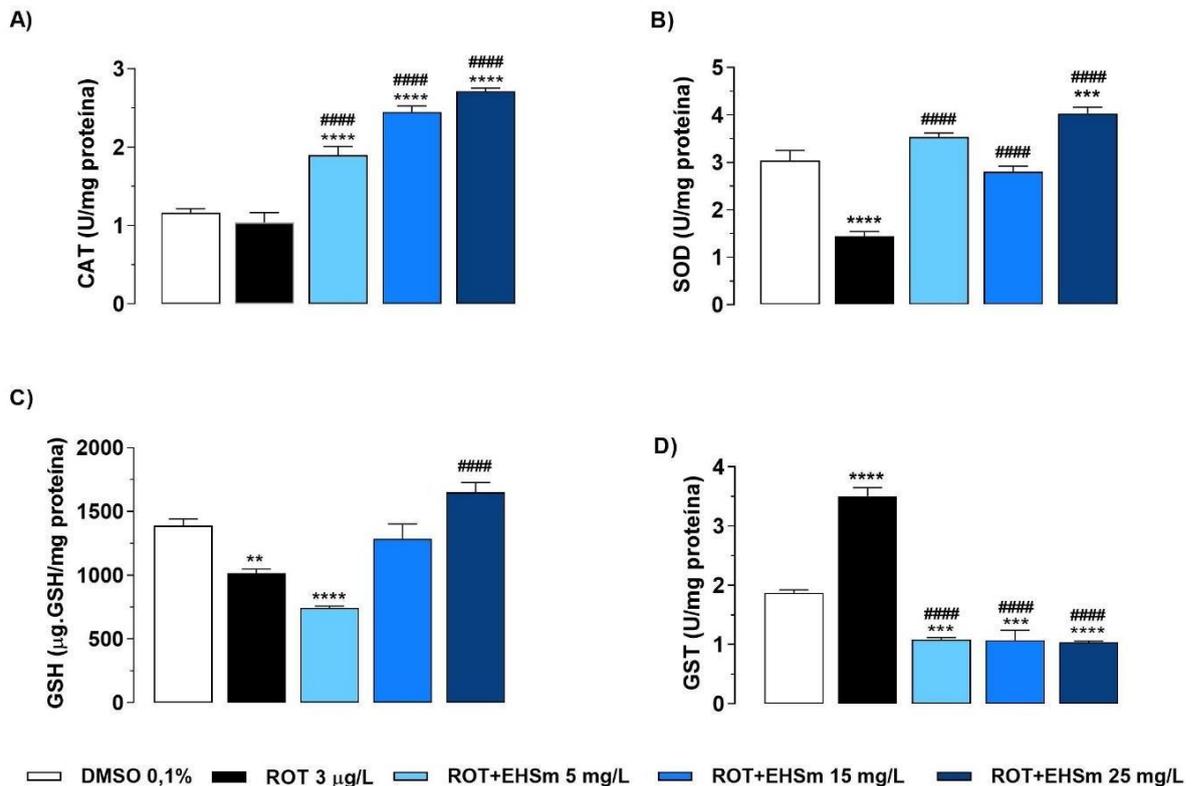


5.6.2 Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), níveis de glutatona (GSH) e atividade da glutatona transferase (GST).

Para avaliar o efeito do extrato EHSm sobre a estrutura cerebral de peixe-zebra, previamente tratada com rotenona, verificou-se a atividade das enzimas antioxidantes CAT (A), SOD (B) e níveis de GSH (D) bem como os níveis de GST (C) previamente tratados com rotenona (Figura 12). A exposição à ROT não interferiu na atividade da CAT quando comparada ao grupo de controle. No entanto, EHSm (5, 15 e 25 mg/L) aumentou significativamente a atividade da CAT em comparação com o grupo de controle em 62,8; 110,1 e 132,9% ($p < 0,0001$), respectivamente (Figura 12-A). ROT diminuiu a atividade de SOD em 52,5% ($p < 0,0001$) em comparação com o grupo de controle. EHSm (5, 15. e 25mg/L) foi eficaz em restaurar a atividade desta enzima em relação ao grupo controle e induziu um aumento significativo (144,8; 93,8 e 78,8%; $p < 0,0001$, respectivamente) quando comparado ao grupo ROT (Figura 12-B).

Os níveis de GSH (Figura 12-C) foram reduzidos em 26,9% ($p = 0,006$) no grupo tratado com ROT e 46,54% ($p < 0,0001$) no grupo tratado com EHSm 5mg/L. O EHSm (25 mg/L) produziu um aumento (62,3%; $p < 0,0001$) nos níveis de GSH em relação ao grupo ROT. A atividade de GST aumentou 87,1% ($p < 0,0001$) no grupo tratado com ROT e ROT + EHSm 5, 15 e 25 mg/L, além disso induziu reduções estatísticas de 42,1 e 42,7% ($p = 0,0001$) e 44,6% ($p < 0,0001$), respectivamente, quando comparado ao grupo de controle e 69,0; 69,4 e 70,4% ($p < 0,0001$) respectivamente em relação ao grupo ROT (Figura 12-D).

Figura 12 - Efeitos da rotenona (ROT) e do extrato hexânico de *S. mombin* (EHSm) sobre a atividade das enzimas catalase (A) e superóxido dismutase (B), níveis de glutatona (C) e atividade de glutatona transferase (D) avaliados em cérebro de peixe-zebra. Os dados são apresentados como média \pm Erro padrão da média \pm E.P.M. n=6. Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle, ##### $p < 0,0001$, comparado ao grupo ROT.

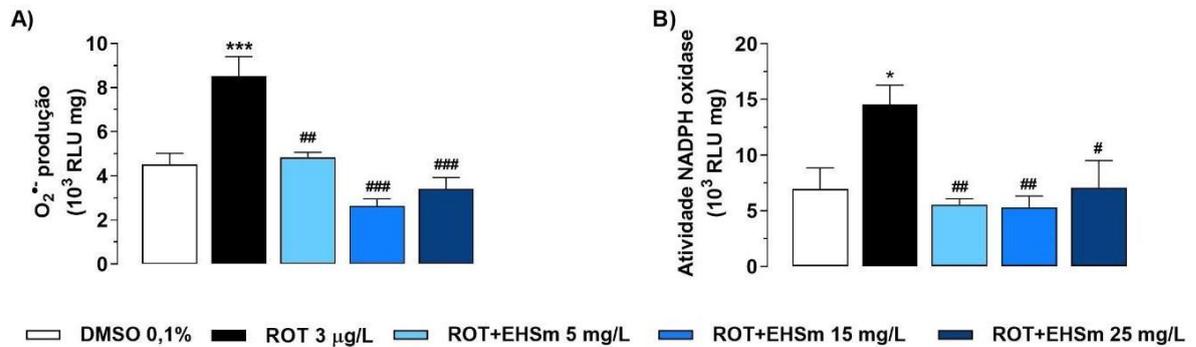


5.6.3 Produção de ânion superóxido (O₂⁻) e atividade da oxidase de dihidronicotinamida-adenina fosfato de dinucleotídeo (NADPH)

A Figura 13 mostra os efeitos de ROT (3 µg/L) e ROT + EHSm (5, 15 e 25 mg/L) na produção de O₂⁻ (Figura 13-A) e atividade de NADPH oxidase (Figura 13-B). A produção do ânion superóxido e a atividade da NADPH oxidase aumentaram significativamente no cérebro do peixe-zebra tratado com ROT (89,1 e 109%, $p=0,0004$ e $p=0,02$, respectivamente).

O EHSm (5, 15 e 25 mg/L) reduziu estatisticamente em (43,3; 69,1 e 59,9% e $p=0,0009$, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente) a produção do ânion superóxido, e também reduziu de forma significativa (61,8; 63,6 e 51,2% e $p=0,005$, $p=0,004$ e $p=0,03$, respectivamente) a atividade da NADPH oxidase em relação ao grupo ROT.

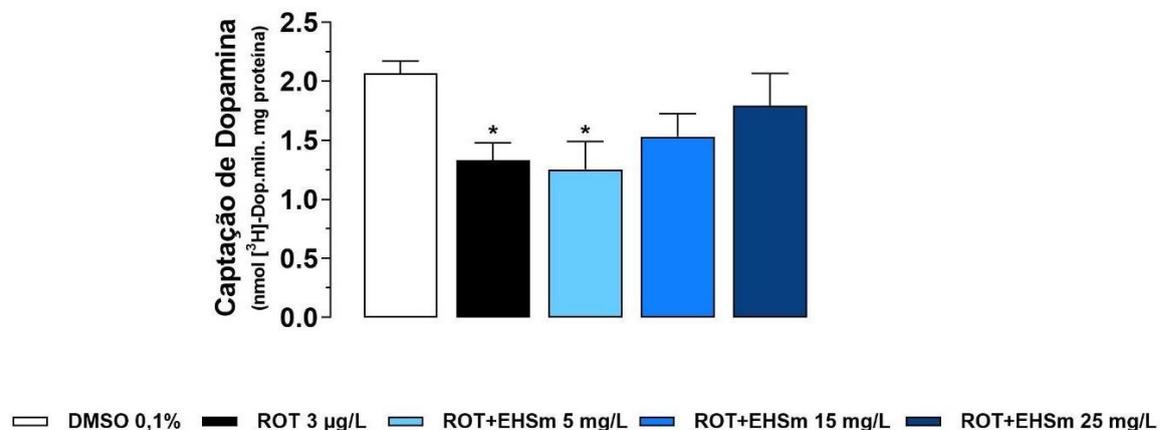
Figura 13 - Efeitos da rotenona (ROT) e do extrato hexânico de *S. mombin* (EHSm) na produção de superóxido basal (A) e atividade de NADPH oxidase (B) avaliada em cérebro de peixe-zebra. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. n=6. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. *p<0,05, ***p<0,005 comparado ao grupo controle, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,005 comparado ao grupo ROT.



5.7 AVALIAÇÃO DO EHSM SOBRE RECAPTAÇÃO DE DOPAMINA EM PEIXE-ZEBRA EXPOSTO A ROTENONA

A Figura 14 mostra os efeitos de ROT (3 µg/L) e ROT + EHSm (5, 15 e 25 mg/L) sobre o transportador de dopamina (DAT). A exposição à ROT diminuiu significativamente a atividade do DAT em 35,7% (p=0,03). O tratamento com EHSm (15 e 25 mg/mL) evitou a inibição induzida pela rotenona na atividade DAT.

Figura 14 - Efeitos de ROT e EHSm na captação de L-[³H] dopamina no cérebro de peixe-zebra. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. n=6. Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. *p<0,05 comparado ao grupo controle.



6 DISCUSSÃO

O aumento da população idosa tem levado a uma crescente incidência de doenças neurodegenerativas, dentre elas a Doença de Parkinson (DP). Estima-se que a DP afeta mais de 10 milhões de indivíduos em todo mundo (HINDLE, 2010). A principal característica neuropatológica da DP, envolve a lesão dos neurônios dopaminérgicos localizados na SNpc, ocasionando uma redução dos níveis de dopamina no estriado, uma das estruturas cerebrais responsável pela função motora, e o aparecimento de agregados proteicos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; AMMAL KAIDERY; THOMAS, 2018).

Diferentes modelos de indução de neurotoxicidade experimental com drogas podem ser usados como 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), paraquat (N, N'-dimetil-4,4'-bipiridinium) e rotenona para reproduzir os sintomas da DP.

O modelo de 6-OHDA causa um fenótipo comportamental consistente nesses modelos e degeneração previsível em neurônios dopaminérgicos, entretanto é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, necessitando ser injetado diretamente nas regiões afetadas. Outro ponto importante, é que o 6-OHDA não mimetiza perfeitamente a doença de Parkinson, que necessita da formação de corpos de Lewy (SAUER E OERTEL, 1994; SCHOBER, 2004).

O MPTP é uma molécula lipofílica e seu mecanismo de morte celular é induzido pela inibição MPP⁺ do complexo I na respiração mitocondrial. Isso resulta em rápida diminuição na concentração de trifosfato de adenosina (ATP) no estriado e SN seguido por apoptose e necrose dos neurônios dopaminérgicos (SAYRE, 1989). Entretanto, o modelo de MPTP também carece da mais importante característica da DP que é a formação dos corpúsculos de Lewy (SCHOBER, 2004). Outra neurotoxina utilizada nos modelos experimentais, o paraquat, é um pesticida, identificado como neurotóxico devido a semelhança estrutural com o MPP⁺ (TIEU, 2011). O paraquat cruza a barreira hematoencefálica por meio de um transportador de aminoácido neutro e, embora, tenha semelhança estrutural com MPP⁺, não inibe o complexo mitocondrial I. Em vez disso, prejudica o ciclo redox da glutatona e da tioredoxina o que representa características patológicas da DP clínica. Dessa forma pode ser útil para estudar os estágios iniciais da doença em comparação com outros modelos, devido ao fato do fenótipo de DP se desenvolver cronicamente (PENG et al, 2007). A rotenona é conhecida pela sua alta lipofilicidade e potente capacidade inibitória do complexo I mitocondrial, especialmente alta

afinidade com NADH desidrogenase (Subramaniam e Chesselet, 2013). Além disso, induz a formação de inclusões citoplasmáticas α -sinucleínas em neurônios nigrais, conhecidos como corpos de Lewy nos neurônios sobreviventes (JOHNSON e BOBROVSKAYA, 2015). Possui também como vantagem o preço.

Embora a etiologia da DP seja multifatorial, estresse oxidativo, inflamação, agregação de proteínas e apoptose parecem contribuir para a neurodegeneração, justificando a necessidade de desenvolver moléculas que possam atenuar simultaneamente essas mudanças (GATT et al., 2016; AARSLAND et al., 2018; LAKKAPPA et al., 2019).

As análises fitoquímicas realizadas no EHSm identificaram a presença de compostos fenólicos, bioflavonóides e tocoferol. A presença de flavonoides e polifenóis já foi relatada para o extrato metanólico (SILVA et al., 2011; CABRAL et al., 2016). Além desses compostos a presença de esteroides, triterpenos, saponinas, taninos e glicosídeos também foi identificada em extratos metanólicos e hidroalcoólicos (NJOKU e AKUMEFULA, 2007; DOS SANTOS SAMPAIO, et al., 2018; BRITO et al., 2018), bem como a rutina, um composto importante no extrato hidroetanólico de *S. mombin* (SILVA et al., 2011). Parece razoável considerar que os compostos fenólicos têm uma contribuição importante para o efeito antioxidante do extrato (PIETTA, 2000). Testes *in vitro* (DPPH, ABTS, CAT e poder redutor) confirmaram a atividade antioxidante de *S. mombin*, também descrita por outros autores (SILVA et al., 2011; CABRAL et al., 2016; e BRITO et al., 2018).

Até o momento, não há estudos na literatura que demonstrem o efeito do EHSm no peixe-zebra. Portanto, foi realizada a determinação da CL_{50} que obteve uma concentração de 58,42 mg/L. Entretanto, DOS SANTOS SAMPAIO et al (2018) encontraram uma $CL_{50} = 49,86$ mg/L do extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin* em peixe-zebra, que está próximo ao valor estimado em nosso estudo.

O uso do teste de novel tank para avaliar indicadores locomotores relacionados à ansiedade é comumente realizado em investigações com peixe-zebra (KYSIL et al., 2017; DOS SANTOS SAMPAIO et al., 2018; REIS et al., 2019). O teste de atividade locomotora não mostrou diferenças significativas entre os grupos controle e rotenona na distância percorrida e no número de travessias. No entanto, comportamentos não motores, comumente presentes na DP, como ansiedade, também foram analisados (ZIEMSEN e REICHMANN, 2007). O mesmo tanque usado para medir a atividade de natação também foi usado para observar o índice de ansiedade, que foi determinado pelo tempo gasto na parte superior do tanque. Após 4

semanas de tratamento com rotenona, os peixes apresentaram redução no número de entradas e no tempo gasto no topo do aparato em comparação aos peixes controle, sugerindo que a rotenona altera o comportamento da atividade exploratória do peixe-zebra. Nesse parâmetro, também observamos que o grupo tratado com ROT + EHSm 25 mg/L não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle, sugerindo que o extrato atenuou os impactos relacionados a ROT. O grupo ROT + EHSm (15 mg/L) apresentou uma redução no número de travessias, número de entradas e tempo na área superior do aparato NTT em relação ao grupo controle. No entanto, deve-se notar que este grupo não diferiu estatisticamente do grupo tratado apenas com rotenona. Pode-se sugerir que esta concentração seja insuficiente para reestabelecer este comportamento. Os nossos resultados estão de acordo com os achados de Bretau et al. (2004) para a rotenona, pois não se observou alteração na atividade motora.

AGUIRRE-HERNÁNDEZ et al. (2016) demonstraram que a mistura de flavonoides, composta por quercetina, isoquercitrina e rutina, foi identificada como parcialmente responsável pelos efeitos ansiolíticos e sedativos de *Tilia americana* var. Mexicana com participação GABAérgica e serotoninérgica. DOS SANTOS SAMPAIO et al. (2018) mostraram que o extrato etanólico da folha de *S. mombin* (25 mg/L) e o antidepressivo fluoxetina (20 mg/kg) tiveram efeito semelhante na reversão do comportamento semelhante à depressão em peixes-zebra induzidos por álcool, estresse leve e isolamento social no novo teste de mergulho em tanque (tempo gasto no topo). Visto que o EHSm apresenta as substâncias citadas nestes estudos, pode-se sugerir que a atividade ansiolítica observada no teste comportamental tenha uma relação com estas substâncias. Talvez pelo fato destes metabólitos possuírem ação antioxidante.

A peroxidação lipídica, causada pela geração excessiva de radicais livres, incluindo EROS, é considerada um evento crucial na etiopatogenia da DP (JAVED et al., 2019). Embora EROS participe da neuro-regulação sináptica envolvida no processo de aprendizagem e/ou manutenção da memória, o desequilíbrio de ROS está intimamente ligado a processos neurodegenerativos e demência (CASAS et al., 2020).

Na verdade, o cérebro é um órgão naturalmente muito suscetível ao estresse oxidativo, devido ao alto uso de oxigênio, alto teor de ácidos graxos poliinsaturados e presença de metais de transição, como ferro e cobre (VALKO et al., 2007) A inibição da peroxidação lipídica por EHSm, observada pela redução dos níveis de TBARS e tiol total, seguido do aumento expressivo das atividades de CAT, SOD e GST, e a consequente diminuição do teor de GSH, podem sugerir uma ação antioxidante efetiva do extrato e maior disponibilidade de glutathione.

Os sistemas antioxidantes enzimáticos (SOD e CAT) e não enzimáticos (GSH) são importantes para a homeostase redox e a proteção celular (NORDBERG e ARNER, 2001). Níveis elevados de GST foram observados em núcleos estriados de indivíduos com DP (SMEYNE et al., 2007). Além disso, com o aumento da enzima GST, ocorre diminuição da glutatona no tecido, uma vez que a enzima catalisa, com o auxílio de GSH, os radicais livres presentes no meio. Um estudo *in vitro* mostrou que o pré-tratamento com rutina (composto com importante atividade antioxidante) evitou a perda de células SH-SY5Y e inibiu a formação de EROS em um modelo de PD rotenona de PD (PARK et al., 2014). SHARMA et al. (2016) demonstraram que o tratamento com rutina aumentou a atividade cerebral de SOD e níveis de GSH em roedores. Além disso, flavonoides como a quercitrina, encontrados em quantidades significativas, também podem ter contribuído para a atividade antioxidante do extrato de EHSm, uma vez que apresentam importantes propriedades antioxidantes e proteção contra a peroxidação lipídica (HONG et al., 2013).

Um possível efeito tóxico do extrato, principalmente sobre o estado oxidativo, parece improvável, considerando que quase todas as respostas ao EHSm apresentaram características antagônicas em relação às obtidas com a rotenona. Além disso, em caso de efeito tóxico do extrato, um efeito sinérgico com a rotenona nos parâmetros bioquímicos analisados seria mais provável.

No estudo atual, o EHSm foi capaz de prevenir mudanças causadas pela ROT nos níveis de O_2^- e NADPH oxidase. A isoforma Nox2 desempenha um papel importante na resposta inflamatória e tem sido considerada um importante alvo terapêutico para doenças inflamatórias e também doenças musculares e neurodegenerativas, incluindo DP (CASAS et al., 2020). Gao et al. (2003) demonstraram a capacidade da rotenona de induzir a neurodegeneração por meio da ativação da produção de superóxido derivado de Nox₂ na microglia. A regulação positiva da NADPH oxidase, incluindo a isoforma Nox2, um importante complexo enzimático produtor de superóxido, foi recentemente associada à patogênese da DP em pacientes humanos e modelos animais, incluindo peixe-zebra (GLASS et al., 2010; WEAVER et al., 2015; PAL et al., 2016). Alterações nos fatores imunológicos podem não apenas causar a morte de neurônios dopaminérgicos, mas também agravar a reação inflamatória e continuar a ativar as células da microglia, gerando radicais livres que podem reagir como macromoléculas biológicas, afetando o equilíbrio redox neuronal (LI et al., 2016). Conseqüentemente, a inibição das reações em cascata da microglia poderia prevenir a degradação neuronal (BURGUILLOS et al., 2011).

A captação de dopamina (DA) via transportador de dopamina (DAT) é o principal mecanismo de regulação dos níveis extracelulares de DA em terminações nervosas dopaminérgicas (BIRTWISTLE e BALDWIN, 1998). No peixe-zebra, os genes relacionados ao DAT foram identificados anteriormente (HOLZSCHUH et al., 2001; BAI e BURTON, 2009).

Estudos demonstraram que a administração de rotenona pode interromper a distribuição e o metabolismo da dopamina (KARUPPAGOUNDER et al., 2013; PENG et al., 2017). Os resultados do presente estudo mostram que o EHSm foi capaz de mitigar os efeitos da ROT na atividade DAT. É possível especular que essa ação do extrato na captação da dopamina possa contribuir para diminuir as consequências dos danos produzidos pela rotenona. Estudos demonstram que a aplicação dos antioxidantes rutina e quercetina parecem proteger neurônios dopaminérgicos dos efeitos da neurotoxina 6-hidroxidopamina, promovendo assim níveis aumentados de dopamina estriatal e sobrevivência neuronal (HALEAGRAHARA et al., 2011; KHAN et al., 2012). O tocoferol, apesar de descrito na literatura como um composto inibidor de peroxidação lipídica, não parece ser um candidato em potencial para um possível efeito antioxidante em virtude de que recentes trabalhos não demonstraram tal efeito (DIPASQUEALE et al., 2020). Além disso, a quercetina, em um modelo de DP induzido por rotenona em camundongos, aumentou a liberação de dopamina no corpo estriado e bloqueou a morte celular programada em neurônios negros (KARUPPAGOUNDER et al., 2013).

7 CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados indica que o extrato hexânico das folhas de *Spondias mombin* apresentou uma melhora significativa em relação ao dano oxidativo e comportamental induzidos pela rotenona, proporcionando efeitos antioxidantes que provavelmente estão relacionados aos compostos fenólicos identificados neste extrato. No entanto, mais estudos são necessários para identificação de um possível composto terapêutico responsável pelas mudanças biológicas identificadas nas respostas anti-inflamatórias e ansiolíticas, bem como os efeitos dos processos de captação neuronal de dopamina, visando esclarecer os potenciais benefícios do EHSm na atenuação das lesões induzidas pela rotenona.

REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D.; CREESE, B.; POLITIS, M.; et al. Cognitive decline in Parkinson disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, p. 217-231, 2017.
- ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 6, p. 494–497, 1999.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGOSTINI, J.F.; DAL TOE, H.C.Z.; VIEIRA, K.M.; et al. Cholinergic System and Oxidative Stress Changes in the Brain of a Zebrafish Model Chronically Exposed to Ethanol. **Neurotoxicology Research**, v. 33, p. 749-758, 2018.
- AGUIRRE-HERNÁNDEZ, E.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M.; TERRAZAS, T.; et al. Anxiolytic and sedative-like effects of flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*: GABAergic and serotonergic participation. **Salud Mental**, v. 39, 2016.
- AJAO, A. O.; SHONUKAN, O.; FEMI-ONADEKO, B. Antibacterial Effect of Aqueous and Alcohol Extracts of. **International Journal of Crude Drug Research**, v. 23, n. 2, p. 67–72, 1985.
- AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience letter**, v. 302, p. 141–145, 2001.
- ALEXANDRE, M.; MENDES, N.V.; TORRES, C.A.; et al. Weekly ethanol exposure alters dopaminergic parameters in zebrafish brain. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 75, p. 1-6, 2019.
- AMMAL, K. N.; THOMAS, B. Current perspective of mitochondrial biology in Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v. 117, p. 91–113, 2018.
- ANICHTCHIK, O.; DIEKMANN, H.; FLEMING, A.; et al. Loss of PINK1 Function Affects Development and Results in Neurodegeneration in Zebrafish. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 33, p. 8199–8207, 2008.
- AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; AKANMU, M. A.; UKPONMWAN, O. E. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 166–175, 2006.
- AYOKA, A. O.; OWOLABI, R. A.; BAMITALE, S. K.; et al. Effect of fractionated extracts and isolated pure compounds of *Spondias mombin* (L. Anacardiaceae) leaves on novelty-induced rearing and grooming behaviours in mice. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines**, v. 10, n. 5, p. 244–255, 2013.

BAI Q.; BURTON E.A. Cis-acting elements responsible for dopaminergic neuron-specific expression of zebrafish *slc6a3* (dopamine transporter) in vivo are located remote from the transcriptional start site. **Neuroscience**, v. 164, p. 1138–1151, 2009.

BAILÃO, E. F. L. C.; DEVILLA, I. A.; CONCEIÇÃO, E. C. DA; BORGES, L. L. Bioactive compounds found in Brazilian cerrado fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23760–23783, 2015.

BANERJEE, R.; STARKOV, A. A.; BEAL, M. F.; THOMAS, B. A high reproducibile rotenone model of Parkinson's disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 11, n. 4, p. 51–76, 2009.

BANNISTER, J.V., CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods Biochemistry**. Anal. 32, p. 279–312, 1987.

BEJJANI, B.-P.; DAMIER, P.; CORNU, P.; et al. Transient Acute Depression Induced by High-Frequency Deep-Brain Stimulation. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 19, p. 1476–1480, 1999.

BETARBET, R.; SHERER, T. B.; MACKENZIE, G.; et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1301–1306, 2000.

BIRTWISTLE J.; BALDWIN D. Role of dopamine in schizophrenia and Parkinson's disease. **British Journal of Nursing**, v. 7, p. 832-841, 1988.

BONIFATI, V.; QUADRI, M.; FANG, M.; et al. Mutation in the *SYNJ1* gene associated with autosomal recessive, early-onset parkinsonism. **Human Mutation**, v. 34, n. 9, p. 1208–1215, 2013.

BONITO-OLIVA, A.; MASINI, D.; FISONE, G. A mouse model of non-motor symptoms in Parkinson's disease: focus on pharmacological interventions targeting affective dysfunctions. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. August, 2014.

BORTOLOTTO, J. W.; COGNATO, G. P.; CHRISTOFF, R. R.; et al. Long-term exposure to paraquat alters behavioral parameters and dopamine levels in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 11, n. 2, p. 142–53, 2014.

BOVÉ C.; PERIER, J. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51–76, 2012.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRETAUD, S.; LEE, S.; GUO, S. Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, n. 6 SPEC. ISS., p. 857–864, 2004.

BRICHTA, L.; GREENGARD, P.; FLAJOLET, M. Advances in the pharmacological

treatment of Parkinson's disease: Targeting neurotransmitter systems. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 9, p. 543–554, 2013.

BRITO, S. A.; LAYSE, C.; ALMEIDA, F. DE; et al. Antiulcer Activity and Potential Mechanism of Action of the Leaves of *Spondias mombin* L .

Oxidative Medicine and Cellular Longevity , v. 2018, 2018.

BURGUILLOS, M.; DEIERBORG, T.; KAVANAGH, E.; et al. Caspase signaling controls microglia activation and neurotoxicity. **Nature**, v. 472, p. 319–324, 2011.

CABRAL, B. **Caracterização dos marcadores químicos e avaliação de atividades biológicas do extrato de *Spondias mombin* (ANACARDIACEAE)**. 2014. 561-565 f. 2014.

CABRAL, B.; SIQUEIRA, E. M. S.; BITENCOURT, M. A. O.; et al. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 3, p. 304–311, 2016.

CALNE, D. A definition of Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 11, n. SUPPL. 1, p. 39–40, 2005.

CANNON, J. R.; TAPIAS, V. M.; NA, H. M.; et al. A high reproducibile rotenone model of Parkinson's disease. **Neurobiology Disorders**, v. 34, n. 2, p. 279–290, 2009.

CASAS, M. P.; CONDE, E.; RIBEIRO, D.; et al. Bioactive properties of *Acacia dealbata* flowers extracts. **Waste and Biomass Valorization**, v. 0, n. 0, p. 0, 2019.

CHAUDHURI, K. R.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 5, p. 464–474, 2009.

COATES I. J., GILPIN M. L.; MCK N. G.; et al. A novel p-lactamase inhibitor isolated from *spondzas mombzn*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 5, p. 654–657, 1994.

CORTHOUT, J.; GEERTS, S.; PIETERS, L.; et al. Antibacterial and Molluscicidal Phenolic Acids from *Spondias mombin*. **Planta Medica**, v. 60, n. 05, p. 460–463, 2007.

COSTA, L.S., FIDELIS, G.P., TELLES, C.B., et al. Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed *Sargassum filipendula*. **Mar. Drugs**. 9, 952–966. 2011.

CUI, W.; ZHANG, Z.; LI, W.; et al. The anti-cancer agent SU4312 unexpectedly protects against MPP + - induced neurotoxicity via selective and direct inhibition of neuronal NOS. **British Journal of Pharmacology** , p. 1201–1214, 2013.

DA SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M. DE; MENDES MARQUES, M. M.; et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 740–746, 2012.

- DAL SANTO, G.; CONTERATO, G. M. M.; BARCELLOS, L. J. G.; ROSEMBERG, D. B.; PIATO, A. L. Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. **Neuroscience Letters**, v. 558, p. 103–108, 2014.
- DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889–909, 2003.
- DE FERREYRA E. C. Planta que curan las heridas del hombre y los animales. **Boletín de lima**. v. 1, p. 12, 1981.
- DEXTERA, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 132–144, 2013.
- DIAS, A. E.; BARBOSA, M. T.; LIMONGI, J. C. P.; BARBOSA, E. R. Speech disorders did not correlate with age at onset of Parkinson's disease. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 74, n. 2, p. 117–121, 2016.
- DIBY, S.B; KONÉ, M; YAPO, A. Potentiel pharmacologique des écorces de tige de *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) sur la motricité in vitro du duodénum de lapin ; une plantemédicinale utilisée dans le traitement traditionnel des troubles digestifs. **Phytothérapie**, v. 10, p. 306-312, 2012.
- DIPASQUALE, M.; NGUYEN, MHL. RICKEARD, B.W.; CESCA, N.; TANNOUS, C.; CASTILLO, SR.; KATSARAS, J.; KELLEY, E.G.; HEBERLE, F.A.; MARQUARDT, D. The antioxidant vitamin E as a membrane raft modulator: Tocopherols do not abolish lipid domains. **Biochim Biophys Acta Biomembr.** v. 11862, 2020.
- DOS SANTOS SAMPAIO, T. I.; MELO, N. C. DE; FREITAS PAIVA, B. T. DE; et al. Leaves of *Spondias mombin* L. a traditional anxiolytic and antidepressant: Pharmacological evaluation on zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Ethnopharmacology**, 2018.
- EDVARDSON, S.; YIM, Y.-I.; ELPELEG, O.; et al. A Deleterious Mutation in DNAJC6 Encoding the Neuronal-Specific Clathrin-Uncoating Co-Chaperone Auxilin, Is Associated with Juvenile Parkinsonism. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36458, 2012.
- ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymology**, v. 186, p. 407–421, 1990.
- FLINN, L.; BRETAUD, S.; LO, C.; INGHAM, P. W.; BANDMANN, O. Zebrafish as a new animal model for movement disorders. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, n. 5, p. 1991–1997, 2008.
- FLINN, L.J.; KEATINGE, M.; BRETAUD, S.; et al. TigarB causes mitochondrial dysfunction and neuronal loss in PINK1 deficiency. **Annals of Neurology**, v. 74, p. 837-847, 2013.
- GAO, H.M.; LIU, B.; HONG, J.S. Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. **Journal Neurosciece**, v. 23, p. 6181-6187, 2003.

- GATT, A.P.; DUNCAN O.F.; PARTICIPA J.; FRANCIS P.T.; BALLARD C.G.; BATEMAN J.M. Dementia in Parkinson's disease is associated with enhanced mitochondrial complex I deficiency. **Movement Disorders**, v. 31, p. 352-359, 2016.
- GEBAUER, D.L., PAGNUSSAT, N., PIATO, A.L., et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology. Biochemistry Behavior**, v. 99, p. 480–486, 2011.
- GEGG, M. E.; SCHAPIRA, A. H. V. Mitochondrial dysfunction associated with glucocerebrosidase deficiency. **Neurobiology of Disease**, v. 90, p. 43–50, 2016.
- GLASS, C. K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M. C.; GAGE, F. H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cells**, v. 140, p. 918-934, 2010.
- GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M.T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 89–98, 2005.
- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biology Chemistry**, v. 249, p. 7130–7139, 1974.
- HALEAGRAHARA, N.; SIEW, C.; MITRA, N.K.; KUMARI, M. Neuroprotective effect of bioflavonoid quercetin in 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress biomarkers in the rat striatum. **Neuroscience Letter**, v. 500, p. 139-43, 2011.
- HAMANO, P. S.; MERCADANTE, A. Z. Composition of carotenoids from commercial products of caju (*Spondias lutea*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 4, p. 335–343, 2001.
- HINDLE, J. V. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. **Age and Ageing**, v. 39, n. 2, p. 156–161, 2010.
- HIRSCH, E. C.; JENNER, P.; PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 28, n. 1, p. 24–30, 2013.
- HISATA, J. Lake and Stream Rehabilitation: Rotenone Use and Health Risks. **Final supplemental environmental impact statement, Washington State Department of Fish and Wildlife**, 2002.
- HÖGLINGER, G. U.; FÉGER, J.; PRIGENT, A.; et al. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 84, n. 3, p. 491–502, 2003.
- HOLZSCHUH, J.; RYU, S.; ABERGER, F.; DRIEVER, W. Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing zebrafish embryo. **Mechanisms of Development**, v. 101, p. 237-243, 2001.
- HONG, H.C.; LI, S.L.; ZHANG, X.Q.; YE, W.C.; ZHANG, Q.W. Flavonoids with α -glucosidase inhibitory activities and their contents in the leaves of *Morus atropurpurea*.

Chinese Medicine, v. 18, p. 19, 2013.

HOWE, K.; CLARK, M.; TORROJA, C.; et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

JANETZKY, B.; HAUCK, S.; YODIM, M. B. H.; et al. Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 169, n. 1–2, p. 126–128, 1994.

JARAMILLO L. J. AND AHUMADA-BARONA J. Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello. **Secab-Colciencias**, p.37 – 204, 1983.

JAVED, H.; AZIMULLAH, S.; MEERAN, M. F. N.; ANSARI, S. A. Neuroprotective Effects of Thymol, a Dietary Monoterpene Against Dopaminergic Neurodegeneration in Rotenone-Induced Rat Model of Parkinson's Disease. **International Journal Molecular Science**, 1538, p. 20–27, 2019.

JOHNSON, M. E.; BOBROVSKAYA, L. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. **Neuro Toxicology**. v.46, p. 101-116, 2015.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 63–75, 2014.

KARUPPAGOUNDER, S.S.; MADATHIL, S.K.; PANDEY, M.; HAOBAM, R.; RAJAMMA, U.; MOHANAKUMAR, K.P. Quercetin up-regulates mitochondrial complex-I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson's disease in rats. **Neuroscience**, v. 236, p. 136–148, 2013.

KHAN, M.M.; RAZA, S.S.; JAVED, H.; et al. Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. **Neurotoxicology Research**, v. 22, p. 1-15, 2012.

KHOTIMAH, H.; SUMITRO, S. B.; WIDODO, M. A. Zebrafish Parkinson's Model: Rotenone decrease motility, dopamine and increase synuclein aggregation and apoptosis of Zebrafish Brain. **International Journal of Pharm Tech Research**, v. 8, n. 4, p. 614–621, 2015.

KYSIL, E.V.; MESHALKINA, D.A.; FRICK, E.E.; et al. Comparative analyses of zebrafish anxiety-like behavior using conflict-based novelty tests. **Zebrafish**, v. 14, p. 197-208, 2017.

LAKKAPPAA, N.; KRISHNAMURTHYA, P. T.; PANDAREESH, M.D.; HAMMOCK, B. D.; HWANG, S.H. Soluble epoxide hydrolase inhibitor, APAU, protects dopaminergic neurons against rotenone induced neurotoxicity: Implications for Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 70, p. 135-145, 2019.

LAMOTTE, G.; MORELLO, R.; LEBASNIER, A.; et al. Influence of education on cognitive performance and dopamine transporter binding in dementia with Lewy bodies. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 146, p. 138–143, 2016.

LI, Z.; ZHENG, Z.; RUAN, J.; LI, Z.; TZENG, C.M. Chronic Inflammation Links Cancer and Parkinson's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, p. 126, 2016.

LIGIERO, C.B.P.; REIS, L.A.; PARRILHA, G.L.; BAPTISTA FILHO, M.; CANELA, M.C. Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química. **Química Nova**, v. 32, p. 1338-1341, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. São Paulo: Nova Odessa, p. 544, 2008.

MACK, J. M.; SCHAMNE, M. G.; SAMPAIO, T. B.; et al. Melatonergic System in Parkinson's Disease: From Neuroprotection to the Management of Motor and Nonmotor Symptoms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

MARCON, M.; MOCELINA, R.; DE OLIVEIRA, D.; DA ROSA, A. S.; HERRMANN, A.P.; PIATO, A. Acetyl-L-carnitine as a putative candidate for the treatment of stress-related psychiatric disorders: Novel evidence from a zebrafish model. **Neuropharmacology**, v. 150, p. 145–152, 2019.

MELO-SILVEIRA, R.F.; FIDELIS, G.P.; VIANA, R.L.; et al. Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extract from a neglected agricultural product: corn cobs. **Molecules**, v. 19, p. 5360–5378, 2014.

MOCELIN, R.; HERRMANN, A.P.; MARCON, M.; et al. N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 139, p. 121–126, 2015.

MOSLEY, R. L.; HUTTER-SAUNDERS, J. A.; STONE, D. K.; GENDELMAN, H. E. Inflammation and adaptive immunity in Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1–17, 2012.

NAGATSU, T.; NAKASHIMA, A.; ICHINOSE, H.; KOBAYASHI, K. Human tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease and in related disorders. **Journal of Neural Transmission**, v. 0, n. 0, p. 1–13, 2018.

NJOKU, P. C.; AKUMEFULA, M. I. Phytochemical and Nutrient Evaluation of Spondias Mombin Leaves. **Pakistan Journal Nutrition**, v. 6, n. 6, p. 613–615, 2007.

NUNES, M. E.; MÜLLER, T. E.; BRAGA, M. M.; et al. Chronic Treatment with Paraquat Induces Brain Injury, Changes in Antioxidant Defenses System, and Modulates Behavioral Functions in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 6, p. 3925–3934, 2017.

NORDBERG J.; ARNÉR E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NWORU, C. S.; AKAH, P. A.; OKOLI, C. O.; OKOYE, T. C. Oxytocic activity of leaf extract of Spondias mombin. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 5, p. 366–371, 2007.

NWORU, C. S.; AKAH, P. A.; OKOYE, F. B. C.; et al. The leaf extract of Spondias mombin L. displays an anti-inflammatory effect and suppresses inducible formation of tumor necrosis

factor- α and nitric oxide (NO). **Journal of Immunotoxicology**, v. 8, n. 1, p. 10–16, 2011.

OLIVEIRA DE VERAS, B.; MELO DE OLIVEIRA, M.B.; GRANJA DA SILVA OLIVEIRA, F.; et al. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 247, 112265, 2020.

OLUFUNKE, O.-D.; AJANI, O. S.; OYEYEMI, M. O.; EKUNDAYO, S. Testicular and epididymal parameters of spondia mombin. L. (Anacardiaceae) protected male Wistar rats exposed to Sodium arsenite. **Global Veterinaria**, v. 12, n. 2, p. 232–236, 2014.

PAL, R.; BAJAJ, L.; SHARMA, J.; et al. NADPH oxidase promotes Parkinsonian phenotypes by impairing autophagic flux in an mTORC1-independent fashion in a cellular model of Parkinson's disease. **Scientific Reports**, v. 6, 22866, 2016.

PANCOTTO, L.; MOCELIN, R.; MARCON, M.; et al. Anxiolytic and anti-stress effects of acute administration of acetyl-L-carnitine in zebrafish. **PeerJ**, v. 6, e5309, 2018.

PARK, S.E.; SAPKOTA, K.; CHOI, J.H.; et al. Rutin from *Dendropanax morbifera* Leveille protects human dopaminergic cells against rotenone induced cell injury through inhibiting JNK and p38 MAPK signaling. **Neurochemistry Research**, v. 39, p. 707–718, 2014.

PENG, K.; YANG, L.; WANG, J.; et al. The Interaction of Mitochondrial Biogenesis and Fission/Fusion Mediated by PGC-1 α Regulates Rotenone-Induced Dopaminergic Neurotoxicity. **Molecular Neurobiology**, v. 54, p. 3783–3797, 2017.

PENG, J.; PENG, L.; STEVENSON, F.F.; DOCTROW, S.R.; ANDERSEN, J.K. Iron and paraquat as synergistic environmental risk factors in sporadic Parkinson's disease accelerate age-related neurodegeneration. **J. Neurosci.** v. 27, p. 6914–6922, 2007.

PICKRELL A. M.; YOULE R. J. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. **Neuron**, v. 85, n. 2, p. 257–273, 2015.

REIS C.G.; MOCELIN R.; BENVENUTTI R.; et al. Effects of N-acetylcysteine amide on anxiety and stress behavior in zebrafish. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, p. 591–601, 2020.

RICO, E.P.; DE OLIVEIRA, D.L.; ROSEMBERG, D.B.; et al. Expression and functional analysis of Na⁺-dependent glutamate transporters from zebrafish brain. **Brain Research Bulletin**, v. 81, p. 517–523, 2010.

RICO, E. P.; ROSEMBERG, D. B.; LANGONI, A. DA S.; et al. Chronic ethanol treatment alters purine nucleotide hydrolysis and nucleotidase gene expression pattern in zebrafish brain. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 6, p. 871–878, 2011.

SAHEED, S.; OLAREWAJU, S. A.; TAOFEEQ, G.; OLATUNDE, S. T.; ALANAMU, A. A. Combined administration of spondias mombin and ficus exasperata leaf extracts stall indomethacin-mediated gastric mucosal onslaught in rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 12, n. 1, p. 45–51, 2015.

SANDERS, L. H.; GREENAMYRE, J. T. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. **Free Radical Biology Medicine**, v. 62, p. 111–120, 2014.

SANTANGELO, G.; PISCOPO, F.; BARONE, P.; VITALE, C. Personality in Parkinson's disease: Clinical, behavioural and cognitive correlates. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 374, p. 17–25, 2017.

SCHAPIRA, A. H. V.; COOPER, J. M.; DEXTER, D.; et al. Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 54, n. 3, p. 823–827, 1990.

SCHAPIRA, A. H. V.; MANN, V. M.; COOPER, J. M.; et al. Anatomic and Disease Specificity of NADH CoQ1 Reductase (Complex I) Deficiency in Parkinson's Disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 55, n. 6, p. 2142–2145, 1990.

SCHNEIDER, S. A.; ALCALAY, R. N. Neuropathology of genetic synucleinopathies with parkinsonism: Review of the literature. **Movement Disorders**, v. 32, n. 11, p. 1504–1523, 2017.

SCHIASSI, M. C. E. V.; SOUZA, V. R. DE; LAGO, A. M. T.; CAMPOS, L. G.; QUEIROZ, F. Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. **Food Chemistry**, v. 245, p. 305–311, 2018.

SAUER H.; OERTEL W.H. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. **Neuroscience**. 1994, v.59, p. 401-415.

SAYRE L.M.; WANG, F.; HOPPEL C.L. Tetraphenylborate potentiates the respiratory inhibition by the dopaminergic neurotoxin MPP⁺ in both electron transport particles and intact mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 161, p. 809–818, 1989.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192–205, 1968.

SHARMA, S.; NARANG, J.K.; ALI, J.; BABOOTA, S. Synergistic antioxidant action of vitamin E and rutin SNEDDS in ameliorating oxidative stress in a Parkinson's disease model. **Nanotechnology**, v. 27, 375101, 2016.

SIDRANSKY, E.; NALLS, M.; AASLY, J.; et al. International Multi-Center Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 361, n. 17, p. 1651–1661, 2009.

SIEBEL, A. M.; BONAN, C. D.; SILVA, R. S. DA. **Zebrafish como modelo para estudos comportamentais**. 2015.

SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M.; et al. Antiviral activities of extracts and phenolic components of two Spondias species against dengue virus. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. 406–413, 2011.

SMEYNE, M.; BOYD, J.; RAVIIE SHEPHERD, K.; et al. GST expression mediates dopaminergic neuron sensitivity in experimental parkinsonism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 6, p. 1977–1982, 2007.

SONG, C.; LIU, B. P.; ZHANG, Y. P.; et al. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, n. August 2017, p. 384–394, 2018.

SCHOBBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell Tissue Res.** p. 215–224. 1994.

STAYTE, S.; VISSSEL, B. Advances in non-dopaminergic treatments for Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. 8 MAY, p. 1–29, 2014.

TERRON, A.; BAL-PRICE, A.; PAINI, A.; et al. **An adverse outcome pathway for parkinsonian motor deficits associated with mitochondrial complex I inhibition.** Springer Berlin Heidelberg, 2018.

TIBURSKI, J. H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; OLIVEIRA GODOY, R. L. DE; PACHECO, S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2326–2331, 2011.

TIEU, K. A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. Cold Spring Harb Perspect Med, v. 1, n. 1, 2011.

VALKO M.; LEIBFRITZ D.; MONCOL J.; CRONIN M.T.; MAZUR M.; TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry Cellular Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VERPOORTE, R.; RUIGROK, C.; SVENDSEN, A. Medicinal Plants of Surinam. **Planta Medica**, v. 46, n. 11, p. 149–152, 2007.

VILLEGAS, L. F.; FERNÁNDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; et al. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 3, p. 193–200, 1997.

WANG, X.; GUAN, Q.; WANG, M.; et al. Aging-related rotenone-induced neurochemical and behavioral deficits: Role of SIRT2 and redox imbalance, and neuroprotection by AK-7. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 2553–2563, 2015.

WEAVER, C.J.; LEUNG, Y.F.; SUTER, D.M. Expression dynamics of NADPH oxidases during early zebrafish development. **Journal of Comparative Neurology**, v. 524, n. 10, p. 2130-2141, 2015.

ZENG, X. S.; GENG, W. S.; JIA, J. J. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. **ASN Neuro**, v. 10, 2018.

ZIEMSEN, T.; REICHMANN, H. Non-motor dysfunction in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 13, p. 323-332, 2007.

APÊNDICE A - ARTIGO ACEITO NA REVISTA COMPARATIVE BIOCHEMISTRY
AND PHYSIOLOGY, PART C

Hexane fraction from *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) prevents behavioral and oxidative status changes on model of Parkinson's disease in zebrafish

Journal Pre-proof

Hexane fraction from *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) prevents behavioral and oxidative status changes on model of Parkinson's disease in zebrafish

Glauca Dal Santo, Bruno Oliveira de Veras, Eduardo Rico, Jacir Dal Magro, Jotele Fontana Agostini, Leucio Duarte Vieira, Jean Felipe Fossá Calisto, Ricieri Mocelin, Vitória de Sá Fonseca, Almir Gonçalves Wanderley



PII: S1532-0456(20)30253-2
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108953>
Reference: CBC 108953

To appear in: *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*

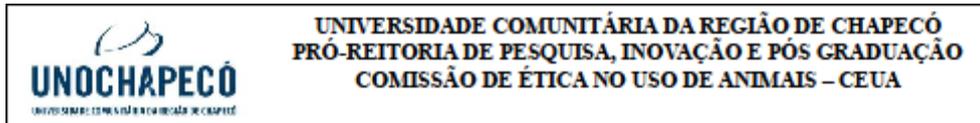
Received date: 22 July 2020
Revised date: 4 December 2020
Accepted date: 6 December 2020

Please cite this article as: G.D. Santo, B.O. de Veras, E. Rico, et al., Hexane fraction from *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) prevents behavioral and oxidative status changes on model of Parkinson's disease in zebrafish, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108953>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Published by Elsevier.

ANEXO A –
CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado “Avaliação da possível atividade neuroprotetora do extrato de folha de *Spondias mombin* em modelo de Parkinson induzido por rotenona em peixe-zebra.” protocolo nº 012/2020, sob a responsabilidade de Jacir Dal Magro que envolve a produção/manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrada (exceto homem), para fins de ensino e pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de oito de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ), em 24/09/2020.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/04/2016 à 20/12/2020
Espécie/Linhagem/Raça	Peixe-zebra ou zebrafish; (<i>Danio rerio</i>)
Nº de animais	58
Peso/Idade	400 – 500 mg; 4 meses
Sexo	Indefinida
Origem	Estabelecimento comercial Mundo Azul

Lilian C. Bohnen

Prof.^a Lilian Caroline Bohnen
Coordenadora da CEUA-Unochapecó